

Kardialer Argininstoffwechsel: Ist Citrullin der Schlüssel?

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

vorgelegt von Marc William Heidorn
aus Frankfurt am Main

Gießen (2020)

Inhaltsverzeichnis

Aus dem Physiologischen Institut
unter der Leitung von Prof. Dr. Rainer Schulz
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Klaus-Dieter Schlüter
2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Niepmann

Tag der Disputation:
25.09.2020

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung1

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen, Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz1

 1.1.1. Epidemiologie und Therapieziele1

 1.1.2. Marker für Remodeling und Herzinsuffizienz1

 1.1.3. Einführung in die Reperfusionproblematik2

 1.1.4. Möglichkeiten der akuten Kardioprotektion, ein Überblick3

 1.1.5. Mortalitätssenkende Therapie von Remodeling und Herzinsuffizienz3

1.2. Arginase - NOS-System4

 1.2.1. NO im kardiovaskulären System4

 1.2.2. Argininstoffwechsel.....5

 1.2.2.1. *NOS und ihre Isoformen*5

 1.2.2.2. *Einfluss der drei NOS-Isoformen auf die Herzfunktion*6

 1.2.2.3. *Arginase als NOS Gegenspieler*7

 1.2.3. NOS8

 1.2.3.1. *Arginin-Quellen*8

 1.2.3.2. *Das L-Argininparadoxon und NOS-Entkopplung*9

 1.2.3.3. *eNOS- Aktivität während Ischämie und Reperfusion*9

 1.2.4. Arginase 10

 1.2.4.1. *Arginaseinduktion und NOS-Inhibition in der kardialen Ischämie*..... 10

 1.2.4.2. *Protektion während der Ischämie durch die Arginase* 11

 1.2.4.3. *Protektive Effekte NOs* 12

 1.2.4.4. *Ambivalenz der Arginase in der späten Reperfusion* 14

 1.2.4.5. *Effekte der Arginaseaktivierung auf das Remodeling* 15

 1.2.4.6. *Zusammenfassung der Arginase vermittelten Effekte* 15

1.3. Beeinflussung des Arginase-NOS-Systems durch L-Arginin und L-Citrullin 15

 1.3.1. Das Arginindebakel: Arginaseaktivierung als Ursache? 15

 1.3.2. L-Citrullin: Der Schlüssel zum Erfolg? 16

1.4. Ziel dieser Arbeit 17

2. Material und Methoden 18

2.1 Material 18

Inhaltsverzeichnis

<u>2.1.1. Versuchstiere</u>	18
<u>2.1.2. Verbrauchsmaterialien</u>	18
<u>2.1.3. Reagenzien/ Chemikalien, Laborbedarf</u>	19
2.1.3.1. <i>Allgemeinbedarf</i>	19
2.1.3.2. <i>Chemikalien/ Reagenzien</i>	20
<u>2.1.4. Geräte:</u>	23
<u>2.1.5. Software</u>	25
<u>2.1.6. Antikörper</u>	25
2.2 Puffer und Medien	26
2.3 Methoden	29
<u>2.3.1. Zellkultur</u>	29
2.3.1.1. <i>Kardiomyozytenisolation</i>	29
2.3.1.2. <i>Zellkultivierung</i>	30
2.3.1.3. <i>Messung kontraktiler Parameter im elektrischen Feld</i>	30
<u>2.3.2. Langendorff-Perfusion</u>	31
2.3.2.1. <i>Versuchstiere und Präparation</i>	32
2.3.2.2. <i>Retrograde Perfusion und Versuchsprotokolle</i>	32
2.3.2.3. <i>Auswertung</i>	34
2.3.2.4. <i>Weiterverarbeitung der Proben</i>	34
<u>2.3.3. Nitritmessung</u>	35
<u>2.3.4. Quantifizierung der Superoxidbildung</u>	35
<u>2.3.5. Expressionsanalyse auf RNA-Ebene</u>	36
2.3.5.1. <i>RNA-Isolation</i>	36
2.3.5.2. <i>Nano-Drop und cDNA-Synthese</i>	37
2.3.5.3. <i>qRT-RCR</i>	37
<u>2.3.6. Expressionsanalyse auf Proteinebene</u>	39
2.3.6.1. <i>Aufbereitung des Herzgewebes</i>	39
2.3.6.2. <i>SDS-PAGE Gelelektrophorese</i>	40
2.3.6.3. <i>Western blot, Bildentwicklung und Auswertung</i>	40
<u>2.3.7. Statistische Auswertung</u>	41

3. Ergebnisse	42
3.1. Kontraktionsverhalten isolierter normoxer Kardiomyozyten	42
<u>3.1.1. Positiv inotrope Effekte L-Citrullins</u>	42
<u>3.1.2. NOS-Abhängigkeit der positiv inotropen Wirkung</u>	43
3.2. Herzfunktion in vitro	44
<u>3.2.1. Akute normoxe Wirkung L-Citrullins</u>	44
<u>3.2.2. Funktionelle Auswirkungen des Infarkts als Modell des Arginindefizits</u>	45
<u>3.2.3. Beeinflussung der postischämischen Funktion durch L-Citrullin</u>	46
<u>3.2.4. NOS-Abhängigkeit der postischämischen Funktionsverbesserung</u>	47
<u>3.2.5. Funktionelle Auswirkung L-Arginins</u>	49
<u>3.2.6. Effekte auf das Herzödem</u>	51
3.3. Linksventrikuläre Superoxidbildung	52
3.4. Initiale Adaptation der perfundierten Herzen auf RNA- und Proteinebene	54
<u>3.4.1. Arginase-NOS-System</u>	54
<u>3.4.2. Hypertrophie und Herzinsuffizienz</u>	56
<u>3.4.3. Fibrose</u>	58
<u>3.4.4. SERCA</u>	59
3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse	61
4. Diskussion	62
4.1. Positiv inotrope Effekte L-Citrullins auf isolierte Kardiomyozyten und das gesamte Herz	62
4.2. Funktioneller Benefit durch L-Citrullin bei IR	63
<u>4.2.1. Kardiale Protektion nur bei postischämischer Applikation</u>	63
<u>4.2.2. Das Arginase/NOS-Systems in der Reperfusion</u>	64
4.2.2.1. <i>NO-Mangel und erhöhter oxidativer Stress limitieren den Reperfusionserfolg</i>	64
4.2.2.2. <i>Funktionelle Konsequenzen der erhöhten Polyaminspiegel</i>	65
<u>4.2.3. Normalisierung des Arginase-NOS-Systems durch L-Citrullin</u>	65
<u>4.2.4. Einfluss von L-Arginin auf dieses System</u>	68
4.3. Effekte auf das initiale Remodeling	69
<u>4.3.1. Arginase-NOS-System</u>	69

Inhaltsverzeichnis

4.3.2. <u>Hypertrophie und Fibrose</u>	69
4.3.3. <u>SERCA</u>	71
4.4. Mögliche klinische Anwendung und Ausblick	72
4.4.1. <u>Myokardinfarkt</u>	73
4.4.2. <u>Hirnfarkt</u>	74
4.4.3. <u>Herzinsuffizienztherapie</u>	74
4.4.4. <u>Arteriosklerose Therapie</u>	75
5. <u>Zusammenfassung</u>	77
6. <u>Summary</u>	78
7. <u>Literaturverzeichnis</u>	79
8. <u>Erklärung</u>	93
9. <u>Anhang</u>	94
9.1. Veröffentlichungen	94
9.2. Danksagung	94
10. <u>Abkürzungsverzeichnis</u>	95

1. Einleitung

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen, Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz

1.1.1. Epidemiologie und Therapieziele

Da kardiovaskuläre Erkrankungen weltweit vor malignen Erkrankungen die häufigste Todesursache darstellen und der akute Myokardinfarkt unter ihnen einen großen Anteil darstellt, ist diese Thematik Gegenstand der aktuellen Forschung (WHO 2014). Voraussichtlich werden diese Krankheiten auch weiter an Bedeutung gewinnen, da der Lebensstil in den Industriestaaten und die zunehmende Lebenserwartung die Entstehung der Atherosklerose als Hauptursache des Myokardinfarkts begünstigen (Weber und Noels 2011). Auch wenn die Patienten oft nicht unmittelbar an dem Infarkt versterben, leiden sie doch oft an den Folgen der anschließenden kardialen Umbauprozesse (Remodeling). Dieses Remodeling ist durch einen fibrotischen, hypertrophen und schließlich dilatativen Umbau des Myokards gekennzeichnet und geht mit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz, die Lebensqualität und Leistungsfähigkeit stark einschränkt, einher (Goel et al. 2013; Bordie et al. 2006; Tham et al. 2015; Widimsky et al. 2010; Vedanthan et al. 2014; Heusch et al. 2014).

Hieraus ergeben sich drei Ziele für die Therapie und Prävention des Myokardinfarkts:

1. Die schnelle und strategisch kluge Reperfusion beim akuten Myokardinfarkt
2. Die Inhibition bzw. die Reversibilität des kardialen Remodelings
3. Die erfolgreiche Prophylaxe durch Minimierung der Entstehung atherosklerotischer Plaques

1.1.2. Marker für Remodeling und Herzinsuffizienz

Um die Auswirkung pharmakologischer Interventionen auf das Remodeling abschätzen zu können, benutzt man Markermoleküle, deren Expression unter pathologischen Bedingungen verändert ist. Die in der Klinik am häufigsten verwendeten Markermoleküle sind die natriuretischen Peptide (NPs) (Baxter 2004; Angermann und Ertl 2004).

Die physiologischen Wirkungen von atrialem-NP (ANP) und B-Typ-NP (BNP) bestehen in gesteigerter Diurese, Vasodilatation und Inhibition der Zellproliferation, womit sie ein Gegengewicht zum unter Herzinsuffizienz aktivierten Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) bilden. Vor allem BNP, das hauptsächlich im Ventrikel gebildet und durch erhöhte Wandspannung freigesetzt wird, bietet sich als Herzinsuffizienzmarker an (Baxter 2004;

Angermann und Ertl 2004). Da seine Wirkung bei dieser Erkrankung allerdings verringert ist, kommen protektive Effekte des Peptids nicht vollständig zum Tragen (Piechota et al. 2008)

Als weiterer Marker für Hypertrophie und Herzinsuffizienz kann Intermedin (IMD) aus der Familie der *calcitonin gene related peptides* (CGRPs) verwendet werden, da es auf Kardiomyozyten sowohl zytoprotektiv als auch antihypertroph wirkt (siehe Übersichtsartikel von Bell und McDermott 2008). Insbesondere die antihypertrophen Effekte konnten 2013 *in vivo* bestätigt werden (Chen et al. 2013).

Neben der Hypertrophie spielt auch die Fibrose eine entscheidende Rolle in der Entwicklung einer Herzinsuffizienz, da sie aufgrund einer Versteifung der Ventrikelwand dessen Relaxationsvermögen stark einschränkt (Swynghedauw 1999). Das kardiale Bindegewebe wird durch die dort lokalisierten Fibroblasten synthetisiert und besteht vor allem aus Kollagen 1 und 3 (COI und III) (Baum und Duffy 2011). Sowohl myozytärer Zelltod als auch andere pathologische Stimuli wie chronische Vor- und Nachlasterrhöhung aktivieren profibrotische Signalwege, die z.B. TNF- α und TGF β involvieren (Kong et al. 2014). Trägt man all dies zusammen, bieten sich COI und III als Effektoren der vielfältigen profibrotischen Signalwege als Fibrosemarker an.

Zudem kommt es im Rahmen des kardialen Remodelings zur Änderung des Ca²⁺-Haushalts. Hier wird die gesteigerte Expression der kardialen sarkoplasmatischen Ca²⁺ ATPase (SERCA2a) generell als protektiv anerkannt, was sie zu einem Indikator für Störungen des kardialen Kalzium-Haushalt macht (siehe Übersichtsartikel von Tham et al. 2015).

1.1.3. Einführung in die Reperfusionproblematik

Bei der schnellen und strategisch klugen Reperfusion mit dem Ziel möglichst viel vitales Myokard zu retten, gibt es einige Probleme. Zunächst geht die Reperfusion mit einem Reperfusionsschaden einher. Dieser sekundäre Gewebsschaden wird durch in der Ischämie entstandene intrazellulär erhöhte Ca²⁺-Konzentrationen verursacht. In der Reperfusion steht den Kardiomyozyten durch ein erneutes Sauerstoffangebot wieder ATP zur Verfügung und der Kontraktionszyklus kann wieder durchlaufen werden. Durch die Überladung des Zytosols mit Ca²⁺ führt dies zu einer Hyperkontraktion mit Zerreißen der Plasmamembran. Über diesen Mechanismus werden intrazelluläre Substanzen wie RNA freigesetzt, die proinflammatorische Wirkung aufweisen (siehe Übersichtsartikel von Dominguez Rodriguez et al. 2014, Kannemeier et al. 2007, McErlean et al. 2000; Santos et al. 2011; Cabrera Fuentes et al. 2014). Die induzierte Entzündungsreaktion ist durch eine vermehrte Infiltration von

Leukozyten, Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Sekretion von gewebeabbauenden Proteasen gekennzeichnet (siehe Übersichtsartikel von Dominguez Rodriguez et al. 2014). Ein weiteres Problem der frühen Reperfusion besteht darin, dass sie teilweise mit gefährlichen Reperfusionarrhythmien einhergeht, die durch spontane Kalzium-Freisetzung (Ca^{2+} -Oszillationen) aus dem mit Ca^{2+} überladenen ER entstehen (siehe Übersichtsartikel von Fröhlich et al. 2013). Ziel bei der Wiedereröffnung des Gefäßes muss es daher sein, den Reperfusionsschaden (RS) zu minimieren.

1.1.4. Möglichkeiten der akuten Kardioprotektion, ein Überblick

Eine Kardioprotektion bei Reperfusion kann durch Konditionierung erreicht werden. Pre- und Postkonditionierung, die sich ihre protektiven Signalwege teilen, bieten hierbei zwei Möglichkeiten, den Reperfusionsschaden zu minimieren (siehe Übersichtsartikel von Heusch 2015). Allerdings ist nur das Postkonditioning für die Therapie des akuten Infarkts im klinischen Alltag geeignet, da der Zeitpunkt des Infarktes trotz guter Kenntnis der Risikofaktoren nicht exakt voraus gesagt werden kann. Als kleine Einschränkung dieser kardioprotektiven Effekte muss man allerdings vermerken, dass nicht alle klinischen Studien den positiven Effekt des Konditionierens bestätigen (siehe Übersichtsartikel von Heusch 2015).

1.1.5. Mortalitätssenkende Therapie von Remodeling und Herzinsuffizienz

Nach erfolgreicher Reperfusion ist das höchste Ziel der anschließenden Therapie, das kardiale Remodeling und damit die Entwicklung einer Herzinsuffizienz zu verhindern. Dafür stehen im klinischen Alltag aktuell fünf Medikamentengruppen zur Verfügung, welche die Prognose verbessern können:

1. Die β -Adrenorezeptorblocker schützen das Herz vor hohen Frequenzen und der kardiotoxischen Wirkung der Katecholamine (Frishman 2003, CIBIS-II Investigators 1999, MERIT-HR Study Group 1999; Packer et al. 2001).
2. ACE-Hemmer sind dazu in der Lage, das durch Angiotensin II (Ang-II) bedingte Remodeling zu verhindern oder zu verlangsamen (Schweitzer et al., 2003; CONSENSUS Trial Study Group 1987; SOLVD Investigators 1991; AIRE Investigators 1993; Pfeffer et al. 1992; SOLVD Investigators 1992).

3. Angiotensinrezeptor-1-(AT-1)-Blocker sind in ihrer Wirkung genauso effektiv wie die ACE-Hemmer (McMurray et al. 2010; Yancy et al. 2013; Swedberg et al. 1999; Pfeffer et al. 2003).
4. Mineralkortikoidrezeptorantagonisten weisen ebenfalls einen positiven Effekt auf kardiale Umbauprozesse auf, da die kardiale Mineralkortikoidrezeptoraktivierung zu Fibrose und Inflammation führt (Bienvenue et al. 2013; Young 2013; Pitt et al. 1999 und 2003; Zannad et al. 2011).
5. Nephrylsininhibitoren verhindern den Abbau von ANP und BNP und verstärken so deren kardioprotektive Wirkung. Dies deutet so erstmalig einen positiven Effekt cGMPs in der Therapie der Herzinsuffizienz an (Mc Murray et al. 2014; Vardeny et al. 2014; Daniels et al. 2007; Lim et al. 2014; Sacks et al. 2014; Packer et al. 2015).

Diese aktuellen Therapieoptionen liefern trotz ihrer guten Wirkung teilweise unbefriedigende Ergebnisse, da die Sterblichkeit durch Herzinsuffizienz immer noch hoch ist (siehe Übersichtsartikel von Tham et al. 2015). Aus diesem Grund ist es wichtig, durch ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge neue Therapieoptionen zu generieren, um die Prozesse des Remodelings in eine kardioprotektive Richtung zu lenken und so vielen Betroffenen zu helfen.

Auch die erfolgreiche Prophylaxe durch adäquate Therapie der Atherosklerose ist noch nicht gegeben (Weber und Noels 2011).

Bezüglich der Probleme, die sich in der Reperfusion und dem Remodeling ergeben, stellt die Beeinflussung des NO-Stoffwechsels ein vielversprechendes pharmakologisches Target dar und soll im folgenden Abschnitt näher erläutert werden.

1.2 Arginase - NOS-System

1.2.1 NO im kardiovaskulären System

Seitdem bekannt ist, dass NO ein potenter Vasodilatator (Furchgott et al. 1980; Palmer et al. 1987), ein Inhibitor der Leukozytenadhärenz am Endothel (Ignarro et al. 1999) und ein wichtiger Regulator des ventrikulären diastolischen Drucks ist (Schulz et al. 2008), rückte es zunehmend in das Interesse der Forschung und stellt ein potenzielles Ziel pharmakologischer

Intervention dar. Dies wurde dadurch verstärkt, dass im Setting der Ischämie/ Reperfusion eine endotheliale Dysfunktion vorliegt. Sie ist durch eine erhöhte endotheliale Permeabilität gekennzeichnet, zu der eine verminderte NO-Synthese beiträgt (Cohen MV et al. 2006). Seitdem gezeigt werden konnte, dass exogene Zufuhr Stickstoffmonoxids mittels NO-Donoren im Setting der Ischämie- Reperfusion (IR) aufgrund einer verbesserten Endothelfunktion und einer verminderten Konzentration an Superoxidradikalen die Infarktgröße verringert, stand die kardioprotektive Wirkung im Mittelpunkt des Interesses (Johnsen G III et al. 1991; Johnson GIII et al. 1990). Allerdings würde die Erhöhung von endogenem NO, durch Erhöhung der intrazellulären Argininkonzentration, einige Vorteile gegenüber einem exogen zugeführten NO-Donor bieten:

1. Es wäre auf zwei Arten spezifischer:
 - a) Die Endothelplasmarelation NOs wäre physiologischer
 - b) Die Bildung von NO wäre auf den Ort des Schadens beschränkt
2. Der Wirkungseintritt wäre schneller
3. Negative Effekte evtl. zu hoher NO-Konzentration könnten verhindert werden (Lefer 1995)

Aus diesen Hypothesen ergab es sich, dass von L-Arginin als natürlichem NO-Donor kardioprotektive Effekte erwartet wurden. In diesem Zusammenhang soll kurz auf den Argininstoffwechsel eingegangen werden.

1.2.2. Argininstoffwechsel

1.2.2.1. NOS und ihre Isoformen

In den Zellen von Säugetieren gibt es im Wesentlichen zwei Enzyme die L-Arginin verstoffwechseln: die NO-Synthase (NOS) und die Arginase.

Es gibt drei Isoformen der NOS:

1. Die endotheliale NOS (eNOS), die konstitutiv exprimiert wird, vor allem in der Plasmamembran lokalisiert und Ca^{2+} -kalmodulinabhängig aktiviert wird.
2. Die neuronale NOS (nNOS), die ebenfalls konstitutiv exprimiert wird, vor allem im Zytosol vorliegt und auch Ca^{2+} -kalmodulinabhängig reguliert wird.

3. Die induzierbare NOS (iNOS), die als Reaktion auf eine Entzündung induziert wird und NO als Radikal nutzt, um Gewebe zu destruieren. Physiologischer Weise scheint diese Eigenschaft der Pathogenabwehr und Einleitung der Wundheilung zu dienen.
(Chen K et al. 2008; Chen K et al. 2009a, Hallemeesch et al. 2003)

L-Arginin wird nun durch die NOS in Anwesenheit einiger Cofaktoren (Sauerstoff, NADPH⁺ H⁺, FAD, FMN, Häm- und Tetrahydrobiopterin) über das Zwischenprodukt N ω -Hydroxy-Arginin (NOHA) zu NO und L-Citrullin umgewandelt (Wu G et al. 1998; Moncada S et al. 1993). L-Citrullin kann in zwei Reaktionsschritten, die durch die Argininosuccinatsynthetase (ASS) und Argininosuccinatyase (ASL) katalysiert werden, zu L-Arginin recycelt werden und so die NOS wieder mit Substrat speisen. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieses Stoffwechselweges ist die ASS-katalysierte Reaktion (Goodwin BL. et al. 2004; Husson A. et al. 2003; Weisinger H. et al. 2001).

1.2.2.2 Einfluss der drei NOS-Isoformen auf die Herzfunktion

Die Wirkung NOs auf die Herzfunktion ist je nach NOS-Isoform und Konzentration an NO verschieden. Dies liegt daran, dass der Diffusionsradius von Stickstoffmonoxid in Kardiomyozyten durch den hohen Gehalt an Myoglobin und die permanente basale Superoxidproduktion eingeschränkt ist und so immer andere Effektoren für das gebildete NO erreichbar sind (Grygelwski et al. 1986; Flogel et al. 2001; Ziolo und Bers 2003; Hare 2004; Hare und Stammler 2005).

So ist die eNOS in den plasmalemmalen und T-tubulären Caveolae zu finden, wo es mit Caveolin 3 assoziiert ist (Massion et al. 2004). Die nNOS hingegen findet sich im sarkoplasmatischen Retikulum, wo sie mit dem Ryanodinrezeptor (RyR2) colokalisiert ist (Elfering et al. 2002). Die kalziumunabhängige iNOS wird sowohl in Kardiomyozyten als auch in inflammatorischen Zellen induziert, wenn diese das Myokard während einer Inflammation infiltrieren (Jung et al. 2000; Kleinert et al. 2003).

Der Einfluss auf die kardiale Kontraktion ist dabei durchaus divergent. So wird eNOS in den plasmalemmalen Caveolae durch Acetylcholin (ACH) sowie den β_3 -Adrenorezeptor stimuliert und cGMP und PKG-abhängig inhibiert sie das $\beta_{1/2}$ -adrenerge „downstream signaling“ (Balingand et al. 1993; Feron et al. 1997; Gauthier et al. 1998). So begrenzt sie die inotrope Antwort auf katecholaminerge Stimulation quasi wie ein endogener β -Blocker. Dieser Schutz

vor Überstimulation wird durch nNOS auf zwei Ebenen unterstützt. Einerseits fördert nNOS die Freisetzung ACHs aus parasympathischen Nervenendigungen und hemmt gleichzeitig die Katecholaminsekretion des Sympathikus (Herring und Paterson 2001; siehe Übersichtsartikel von Massion et al. 20005). Zusätzlich kann dieses Enzym L-Typ Ca^{2+} -Kanäle als positiv inotropen Effektor der Herzmuskelzellen inhibieren (Ashley et al., 2002).

Diesen negativ inotropen Effekten steht eine kardiostimulatorische Wirkung gegenüber. So ist eNOS in den T-Tubuli lokalisiert (Pertoff et al. 2002). In diesem Fall aktiviert sie den colokalisierten RyR2 und bedingt so eine positiv inotrope Antwort (Prendergast et al. 1997). Auch nNOS kann durch ihre sarkoplasmatische Lokalisation auf SERCA aktivierend wirken, was ebenfalls eine positiv inotrope Antwort nach sich zieht (Khan et al. 2003). So können die T-tubuläre eNOS und nNOS gemeinsam für ein effizienteres Ca^{2+} -Cycling sorgen und so vor einem akuten Pumpversagen schützen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass NO eine normale Herzfunktion aufrechterhält und vor adrenerger Überstimulation schützt.

1.2.2.3. Arginase als NOS Gegenspieler

Der zweite Stoffwechselweg, der von L-Arginin beschriftet werden kann, beginnt mit der Arginase. Es gibt zwei Isotypen dieses Enzyms:

1. Die Arginase I, die im Zytosol lokalisiert ist
2. Die Arginase II, die vorwiegend im Mitochondrium lokalisiert ist (Jenkinson et al. 1996; Morris et al. 1999)

Wenn im folgenden Text nicht näher definiert wird, um welche Arginase es sich handelt, gilt die Aussage für beide Isoenzyme. Die Arginase spaltet Arginin hydrolytisch in Ornithin und Harnstoff. Je nach Isoenzym wird diese Reaktion im Mitochondrium oder Zytosol katalysiert. Das entstandene Ornithin kann nun entweder über die Ornithinaminotransferase (OAT) im Mitochondrium und weiteren Enzymen zu Prolin und Glutamat reagieren oder durch die Ornithindecaboxylase, dem Schlüsselenzym des Polyaminstoffwechsels, zu Putrescin, Spermidin und Spermin (Polyamine) metabolisiert werden (Gonon et al. 2012; Morris et al. 2005; WU und Morris 1998).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass wenn Arginin durch die NOSs verbraucht wird, NO, ein pharmakologisches Zielmolekül, entsteht. Wird es durch die Arginase verbraucht, steigen die intrazellulären Konzentrationen von Polyaminen, Glutamat und Prolin an. Welcher Stoffwechselweg vornehmlich besprochen wird, hängt von den Expressionen sowie der Aktivität der beiden Argininverbraucher ab. Fig. 1 fasst den Argininstoffwechsel zusammen.

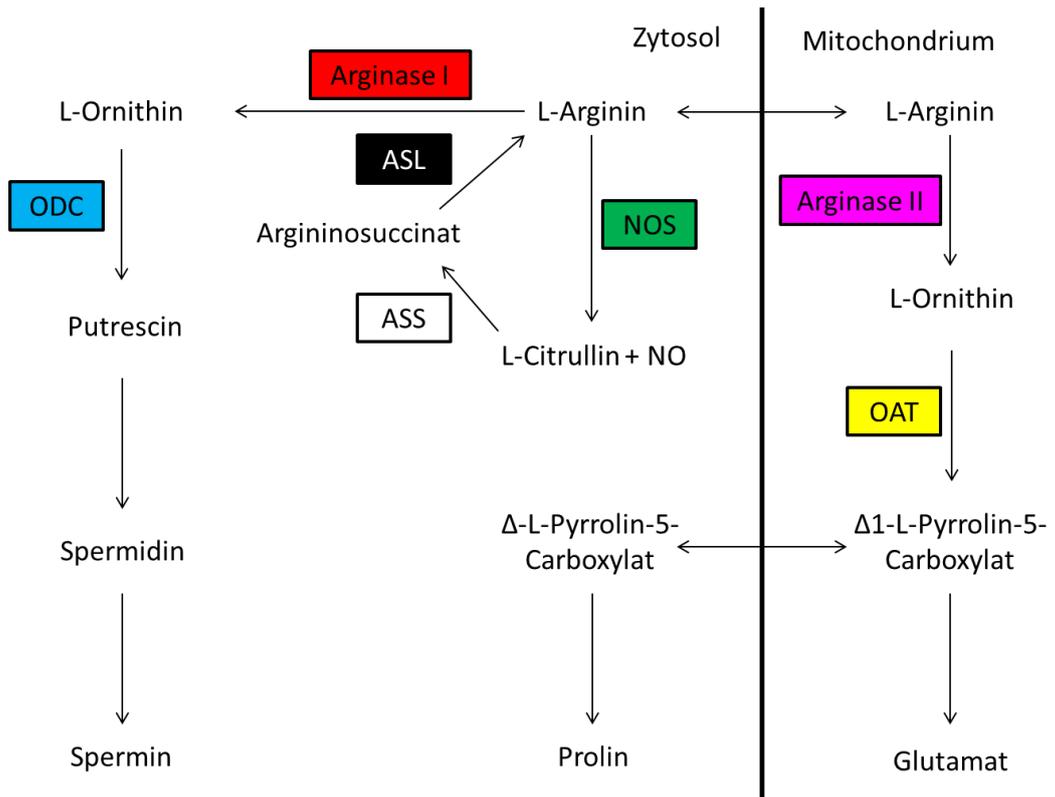


Fig.1: Argininstoffwechsel und seine intrazellulären Lokalisationen (modifiziert nach Wu und Morris 1998).

1.2.3. NOS

1.2.3.1. Arginin Quellen

Nach der Darstellung des Argininstoffwechsels soll nun auf die funktionellen Auswirkungen der einzelnen Wege eingegangen werden. Die primär in der Membran lokalisierte eNOS bezieht ihr Arginin aus drei Quellen:

1. Extrazelluläres Arginin, das durch den Arginintransporter CAT-1 aufgenommen wird
2. L-Arginin, das aus L-Citrullin regeneriert wurde
3. L-Arginin, das beim proteolytischen Abbau intrazellulärer Proteine freigesetzt wird (siehe Übersichtsartikel von Wu und Morris 1998)

Die Hauptquelle stellt allerdings das von extrazellulär aufgenommene Arginin dar, weil CAT-1 mit der eNOS in Caveolae colokalisiert ist. Das Recycling aus L-Citrullin dient im Wesentlichen dazu, die NO-Produktion aufrecht zu erhalten, wenn extrazelluläres Arginin nicht verfügbar ist. Die Proteindegradation als potenzielle Quelle spielt lediglich eine untergeordnete Rolle (siehe Übersichtsartikel von Wu und Morris 1998).

1.2.3.2. Das L-Argininparadoxon und NOS-Entkopplung

Es stellte sich die Frage, warum durch exogenes L-Arginin die NO-Produktion gesteigert werden konnte (Maxwell und Cooke 1998; Harrison 1997; Wu et al. 1999), obwohl die zytosolische Arginkonzentration die eNOS jederzeit sättigen sollte (L-Arginin-Paradoxon) (Pollock et al. 1991). Dies konnte durch die Kompartimentierung der eNOS in den Caveolae und die Colokalisierung mit CAT-1 erklärt werden, sodass ein lokaler Argininmangel die NO-Synthese limitieren kann (Cynober et al. 1995; Mc Donald et al. 1997; Schulze et al. 2006).

Hinzu kommt, dass die NOS in zwei Zuständen arbeiten kann. Einmal kann sie, wie bereits beschrieben, aus L-Arginin mit den Cofaktoren NADPH, Sauerstoff und Tetrahydrobiopterin (BH₄), L-Citrullin und NO bilden (siehe Übersichtsartikel von Wu und Morris 1998). Dieser Zustand wird als gekoppelter Zustand bezeichnet. Ihm gegenüber steht der entkoppelte Zustand, bei dem der Elektronentransfer L-Arginin unabhängig erfolgt. In diesem Fall wird von der NOS das Superoxidanion gebildet. Dieser Zustand wird durch geringe L-Argininverfügbarkeit sowie einem erhöhten Quotienten aus Dihydrobiopterin (BH₂) und BH₄ begünstigt (Schmidt und Alp 2007; Vasquez-Vivar et al. 2002; Abou-Mohammed et al. 2004; Kaemeyer et al. 2000). Für die Ischämie-Reperfusion (IR) konnte bereits gezeigt werden, dass NOS-Kopplung die Infarktgröße reduziert (Perkins et al. 2012).

1.2.3.3. eNOS- Aktivität während Ischämie und Reperfusion

Des Weiteren ist zu beachten, wie es sich mit der Enzymaktivität während der IR verhält. Hier ist zwischen Low-Flow und No-flow Ischämie zu unterscheiden. Während der No-flow Ischämie bleibt die eNOS- Aktivität in den ersten 30 min konstant, fällt aber bei Ischämien von mindestens einer Stunde stark ab. In der Reperfusion gibt es eine Teilnormalisierung der

NOS-Aktivität. Dies wurde von Giraldez et. al 1996 durch eine Veränderung der chemischen Eigenschaften der für die Proteinfunktion essentiellen Aminosäuren durch die ischämiebedingte Azidose erklärt. Dies führt im nächsten Schritt zu einer teilweisen Entfaltung des Enzyms. Diese beiden ersten Schritte sind reversibel und erklären die teilweise Normalisierung der NOS-Aktivität in der Reperfusion. Im dritten und letzten Schritt der NOS-Degradation wird das teilweise entfaltete Protein durch Ischämie-aktivierte Proteasen irreversibel abgebaut. Der letzte Schritt erklärt, warum nicht die gesamte NOS-Aktivität in der Reperfusion regeneriert werden kann (Giraldez et al. 1996). Dies bedeutet, dass die volle Protektion durch eNOS nur dann erreicht werden kann, wenn relativ schnell reperfundiert wird. Während einer Low-Flow Ischämie konnte eine Aktivierung der eNOS nachgewiesen werden. In diesem Fall wirkt die NOS-Inhibition während der Ischämie protektiv (Depre et al. 1996). Dies deutet darauf hin, dass auch während der frühen No-Flow-Ischämie gebildetes NO eher destruktiv wirkt und den Erfolg der Akuttherapie des Myokardinfarkts limitieren kann. Therapieziele sind daher:

1. Zeitnahe Förderung des gekoppelten Zustands der eNOS in der Reperfusion
2. Geringe NOS-Aktivität während der Ischämie

1.2.4. Arginase

Wie bereits erwähnt, kann L-Arginin auch durch die Arginase verbraucht werden. Die Arginaseaktivierung ist die schnellste bekannte Adaption des Herzens an eine Ischämie (Harpster et al. 2006) und ist auch bei anderen Erkrankungen (Diabetes, Trauma, pulmonale Hypertonie, Sichelzellanämie, Atherosklerose und Herzinsuffizienz und andere) relevant (Berkowitz et al. 2003; Bivalacqua et al 2001; Boelens et al. 2005; Ming et al. 2004; Spolarics et al. 1989; Tsuei et al. 2005; Xu et al. 2004). Dies deutet darauf hin, dass die Arginaseinduktion eine universelle Antwort auf Gewebsschaden ist und daher in der Pathophysiologie vieler kardiovaskulärer Erkrankungen eine Schlüsselrolle spielen kann.

1.2.4.1. Arginaseinduktion und NOS-Inhibition in der kardialen Ischämie

Der Mechanismus der Induktion soll an dieser Stelle kurz dargestellt werden. Im Falle der IR entsteht durch die Ischämie eine Kalziumüberladung des Zytosols, die in der Reperfusion zur Hyperkontraktion führt. Diese Hyperkontraktion führt zum Zerreißen der Zellmembran, was die Freisetzung intrazellulärer Substanzen bedingt (Hearse et al. 1973). Unter diesen befindet sich eRNA, deren Rolle als potenter Entzündungsmediator kürzlich entdeckt wurde. Sie aktiviert die Sheddase TACE (TNF- α -Converting-Enzyme), die wiederum TNF α aus seiner

membrangebundenen inaktiven Form (ProTNF α) in die aktive Form überführt (Cabrera Fuentes et al. 2014). Nach der Bindung von TNF α an seinen Rezeptor wird Arginase I (Schreckenber et al. 2015) und der Transkriptionsfaktor AP-1 aktiviert, der an die Promotorregion der Arginase I bindet (Zhu et al. 2009). Zusätzlich werden unter hypoxischen Bedingungen die Transkriptionsfaktoren c-Jun und ATF-2 (Activating transcription factor-2) an die AP-1 Bindungsstelle rekrutiert (Singh et al. 2014; Zhu et al. 2009).

Die Aktivierung von AP-1 führt der Ischämie zur Induktion 15 verschiedener Gene. Dies legt nahe, dass der Transkriptionsfaktor eine Schlüsselrolle bei der Adaption an Hypoxie spielt (Harpster et al. 2006).

Auch die Arginase II wird unter Hypoxie durch die miR-17-5q (eine microRNA) induziert. Diese Induktion wurde an glatten Muskelzellen beschrieben und wird durch den PI3K-Akt/RISK-Signalweg abgeschwächt (Jin et al. 2014; Chen et al. 2014). Ob die Arginase II-Expression in Herzmuskelzellen genauso reguliert wird, ist allerdings noch unklar.

Hieraus ergibt sich, dass unter IR-Bedingungen durch die Arginaseinduktion der Argininverbrauch von der NOS zur Arginase verschoben wird (Hein et al. 2003). Die erhöhte ROS-Bildung in der Reperfusion fördert ebenfalls die Arginaseaktivität durch S-Nitrosylation, die mit einem verringerten K_M -Wert gegenüber L-Arginin einhergeht und so für einen noch effektiveren Argininverbrauch sorgt (siehe Übersichtsartikel von Schlüter et al. 2015). Die großen Mengen an ROS können nicht durch die Arginase alleine beseitigt werden. Daher wird sie durch die Superoxiddismutase unterstützt, die eine endotheliale Dysfunktion nach Stimulation verhindern kann (Zhang et al. 2010). Auch die Proteinkinase C-(PKC) α wird hypoxieabhängig aktiviert und kann durch Phosphorylierung der eNOS an Thr 495 deren Aktivität senken, während sie gleichzeitig den Transkriptionsfaktor AP-1, der nicht nur die Arginaseinduktion, sondern auch den Arginintransport durch Induktion des Arginintransporters CAT-2 fördert, aktiviert (Visigalli et al. 2010).

1.2.4.2. Protektion während der Ischämie durch die Arginase

All diese Anpassungsreaktionen während der Ischämie verschieben den L-Argininverbrauch von der NOS zur Arginase, da die Arginase I-Aktivierung einer NOS-Inhibition gegenüber steht. Somit wird der intrazelluläre Argininpool verringert, was Zellen vor hypoxischem Schaden zu schützen scheint und dafür sorgt, dass NOS weiter transkribiert wird, da hohe Argininkonzentrationen die NOS-Expression verringern (siehe Übersichtsartikel von Schlüter et al. 2015).

Auch die möglicherweise während der Ischämie schädliche NO-Bildung wird hierdurch wirkungsvoll begrenzt (Depre et al. 1996).

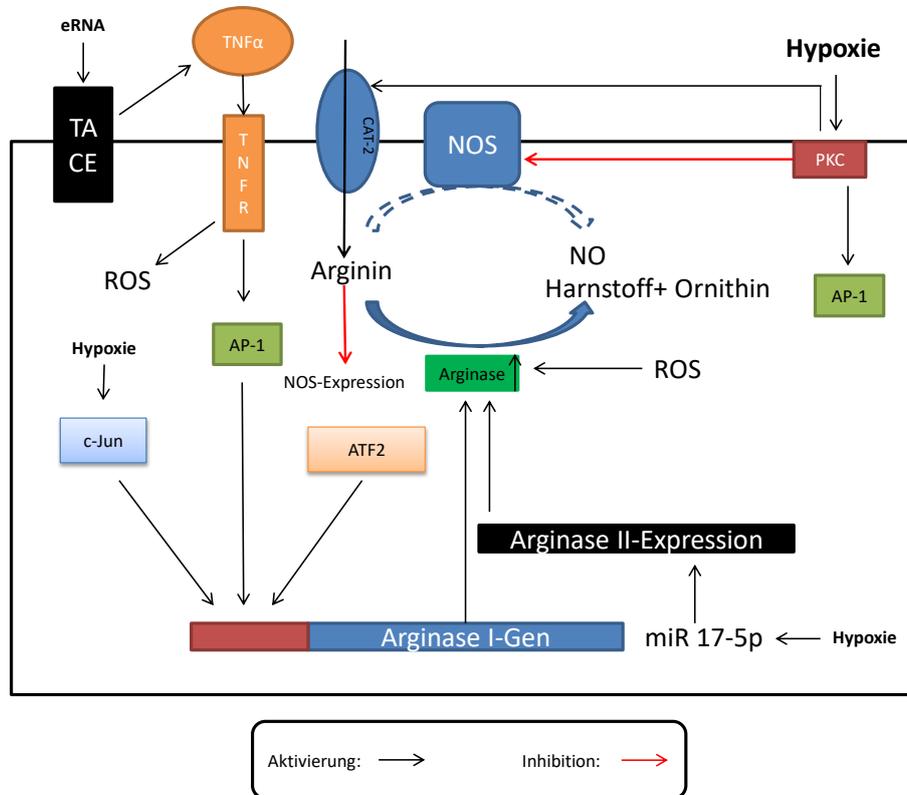


Fig.2: Induktion und Aktivierung der Arginase sowie mögliche protektive Effekte während der Ischämie (nach Schlüter et al. 2015)

1.2.4.3. Protektive Effekte NOs

Diese wirkungsvolle Adaption an die Ischämie wird in der Reperfusion zu einem Nachteil, da die hohe Arginaseaktivität die Argininverfügbarkeit der eNOS limitiert. Wie bereits erwähnt arbeitet eNOS bei geringer Argininverfügbarkeit im entkoppelten Zustand, so dass anstelle von kardioprotektivem NO das Superoxidanion gebildet wird (Abou-Mohammed et al. 2004; Kaemeyer et al. 2000). Dieser NO-Mangel verursacht eine IR induzierte endotheliale Dysfunktion (Cohen et al. 2006). Des Weiteren wirkt NO Arrhythmien entgegen, da durch die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase cGMP aus GTP gebildet wird. Dieser second messenger aktiviert die Proteinkinase G (PKG), die durch Phosphorylierung die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle hemmt und so vor kreisenden Erregungen schützt (Massion et al 2005). Außerdem werden auch ATP-sensitive K-Kanäle, *funny channels* und die schnellen Na^{+} -Einströme NO/

cGMP abhängig moduliert, was einen antiarrhythmischen Effekt unterstützt (Fischmeister et al. 2005).

Neben dem Schutz vor Arrhythmien kann NO auch direkt den Reperfusionsschaden begrenzen. Zum Beispiel wird der Na^+/H^+ -Austauscher (NHE) durch PKG-abhängige Phosphorylierung gehemmt. Hierdurch wird die Normalisierung des nach der Ischämie intrazellulär azidotischen pH-Werts verzögert (Inserete et al. 2011), was die Öffnung der MPTP (mitochondriale Permeabilitäts und Transitions-pore) verhindert und so die Infarktgröße begrenzt (Piper et al. 2004; Choen et al. 2007). Unterstützt wird dies durch die PKG-abhängige Öffnung des mitochondrialen K_{ATP} -Kanals, dem ähnliche Effekte zugesprochen werden (Oldenburg et al. 2004; Penna et al. 2007). Auch die initiale Hyperkontraktion kann durch NO, aufgrund einer PKG-vermittelten Troponinphosphorylierung, die zu einer Ca^{2+} -Desensitivierung führt, vermindert werden. Es sind allerdings auch PKG unabhängige Effekte cGMPs bekannt. Hierzu gehört unter anderem die Steigerung der zytosolischen cAMP-Konzentration durch Phosphodiesterase III (PDE III)-Inhibition. Das so in geringerem Maße abgebaute cAMP ist seinerseits in der Lage viele andere Proteine zu regulieren und so die Herzfunktion zusätzlich zu beeinflussen (Massion et al. 2005).

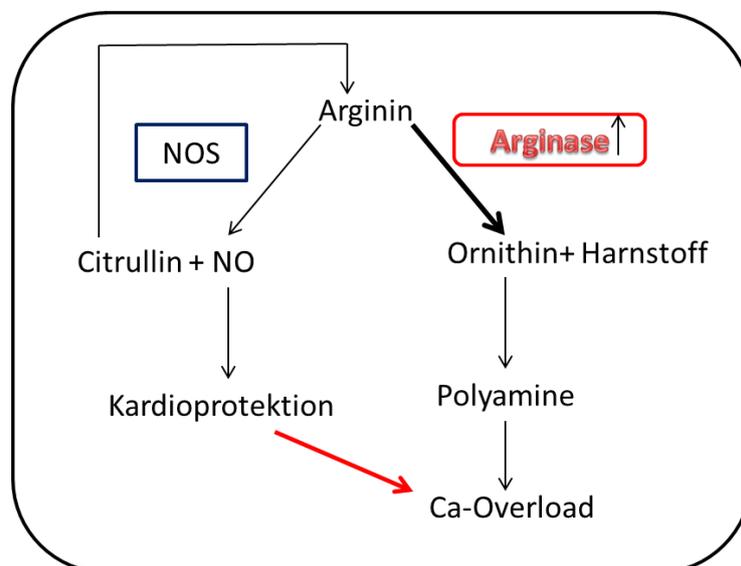


Fig.3: Argininstoffwechsel in der frühen kardialen Reperfusion: Durch die erhöhte Arginaseaktivität wird einerseits der Argininpool der NOS vermindert, sodass weniger NO und L-Citrullin gebildet werden. Somit fallen die kardioprotektiven Effekte des NOs weg. Andererseits akkumulieren Ornithin und Harnstoff. Ornithin wird zu Polyaminen, die die Überladung des Zytosols mit Kalzium fördern, verstoffwechselt (modifiziert nach Schlüter et al. 2015).

Durch die erhöhte Arginaseaktivität wird nicht nur weniger NO gebildet, was antihypertroph wäre (Booz et al. 2005), sondern auch das entstandene Ornithin wird weiter zu Polyaminen verstoffwechselt. Freigesetzte Polyamine binden an den Ca^{2+} -sensing-Rezeptor (CaSR), was zu einer zusätzlichen Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt (Dyukova et al. 2014) und so über einen IP_3 -abhängigen Mechanismus das Risiko von Arrhythmien noch weiter steigert (Schreckenberget al. 2014). Des Weiteren wirken Polyamine in hohen Konzentrationen proapoptotisch (Giordano et al. 2010; Mörlein et al. 2010). Die verminderte Bildung von NO und die erhöhte Bildung der Polyamine steigern also den Reperfusionsschaden und das Risiko von Arrhythmien, sodass der Reperfusionserfolg limitiert wird.

1.2.4.4. Ambivalenz der Arginase in der späten Reperfusion

In der späten Reperfusion hingegen kommt es zur Induktion der iNOS. Dieses Enzym bildet NO in so hohen Mengen, dass es aufgrund seiner chemischen Eigenschaften als hochreaktives Radikal destruktiv wirkt. In diesem Fall würde die Arginase den Argininpool der iNOS begrenzen und so wieder kardioprotektiv wirken, sofern diese Wirkung die maladaptiven Effekte der Arginase überschattet (siehe Übersichtsartikel von Schlüter et al. 2015).

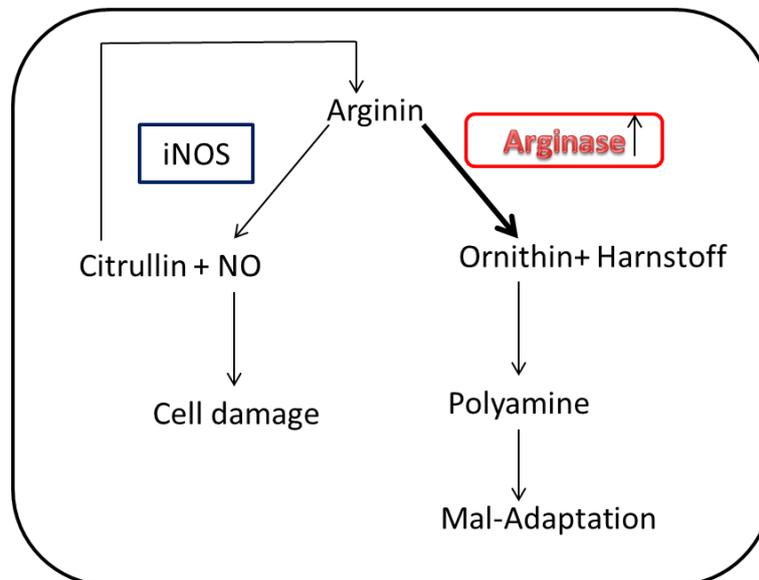


Fig.4: Argininstoffwechsel in der späten kardialen Reperfusion: Durch die Infiltration von Leukozyten, die iNOS exprimieren, wird NO in so hohen Konzentrationen gebildet, dass das Gewebe beschädigt wird. Die Arginaseaktivierung sorgt in diesem Fall zwar für eine verminderte NO-Synthese, aber auch dafür, dass über das Zwischenprodukt Ornithin maladaptive Polyamine gebildet werden (modifiziert nach Schlüter et al. 2015).

1.2.4.5. Effekte der Arginaseaktivierung auf das Remodeling

Durch die Arginaseaktivierung kommt es zu erhöhten Polyaminkonzentrationen. Die Polyamine binden an den CaSR und begünstigen die Neubildung von Sarkomeren, was, wenn sie im Überschuss vorliegen, zu einer Hypertrophie führen kann (Djukova et al. 2014). Des Weiteren kann das entstandene Ornithin zu Prolin verstoffwechselt werden. Prolin ist eine für die Kollagensynthese unerlässliche Aminosäure und könnte daher die Kollagensynthese und somit den fibrotischen Umbau des Myokards fördern. Diese Hypothese wurde bereits von Hui et al. für das vaskuläre Remodeling geäußert (Hui et al. 2000).

1.2.4.6. Zusammenfassung der Arginase vermittelten Effekte

Alles in allem lässt sich daher sagen, dass die Arginaseaktivierung eine wirkungsvolle Adaption von Gewebe an eine Hypoxie darstellt, diese Aktivierung aber in der frühen Reperfusion zu einem massiven Nachteil wird, da sie die produzierte Menge NO limitiert. Stattdessen wird mehr ROS durch eNOS-Entkopplung generiert und eine Maladaption begünstigt. Dies lässt erwarten, dass eine Arginaseinhibition sowohl funktionell in der frühen Phase der Reperfusion als auch in der Therapie des Remodelings positive Effekte haben müsste. Im Falle der Reperfusion konnte dies mit Nor-NOHA, einem Arginaseinhibitor, bereits anhand einer Reduktion der Infarktgröße gezeigt werden (Jung et al. 2010).

1.3. Beeinflussung des Arginase/NOS-Systems durch L-Arginin und L-Citrullin:

1.3.1 Das Arginindebakel: Arginaseaktivierung als Ursache?

Da in der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen endogenem NO mehr protektive Effekte zugesprochen wurden als exogen zugeführtem, war es lange das Ziel einiger Arbeitsgruppen, die NOS-abhängige NO-Synthese zu steigern (Lefer, 1995). Dies wurde zunächst mit vermehrtem Substratangebot durch Gabe von L-Arginin versucht. In der Tat konnte ein protektiver Effekt im Falle des IR-Schadens nachgewiesen werden, wenn Arginin präischämisch gegeben wurde (Agullo et al. 1999). Allerdings zeigte sich in neueren Studien, dass L-Arginin bei Schweinen kaum die NO-Produktion steigert und keine postischämische Verbesserung der Herzfunktion zeigt (Anderson et al. 2012). Auch der Versuch, dem ventrikulären Remodeling bei spontan hypertensiven Ratten mittels L-Arginin vorzubeugen, scheiterte (Brooks et al. 2009). Diese Ergebnisse zeigen, dass L-Arginin nicht die optimale Variante zu sein scheint, den NO-Stoffwechsel zu beeinflussen, da L-Arginin im Falle einer

Arginaseinduktion vornehmlich zu Polyaminen und Prolin verstoffwechselt wird. Wie bereits beschrieben, steigern Polyamine das Risiko für Reperfusionsarrhythmien und können gemeinsam mit Prolin das ventrikuläre Remodeling in eine prohypertrophe und fibrotische Richtung begünstigen. Dies könnte auch erklären, warum die orale Gabe von L-Arginin in der Therapie des akuten Myokardinfarkts die Herzfunktion nicht beeinflusste, aber mit einer erhöhten Mortalität in der Behandlungsgruppe einherging (Schulmann et al. 2006). Zusätzlich wird dieser Teufelskreis dadurch unterstützt, dass hohe Argininkonzentrationen die Arginase in einigen Geweben induzieren und sich eine orale Applikation von L-Arginin als äußerst schwierig darstellt, da es einem sehr ausgeprägten enterohepatischen First-Pass-Effekt unterliegt (Jean et al. 2001; Morris et al. 1992; Socha et al. 2006; van de Poll et al. 2004).

1.3.2. L-Citrullin: Der Schlüssel zum Erfolg?

Eine attraktive Alternative zu L-Arginin stellt die Gabe von L-Citrullin dar, da es einem geringen First-Pass-Effekt unterliegt und so besser oral appliziert werden kann (Shearer et al. 1997; Smith et al. 2006). Des Weiteren kann L-Citrullin in L-Arginin umgewandelt werden, wobei die ASL mit der eNOS in den Caveolae colokalisiert ist und so zu einer lokalen Erhöhung der Argininkonzentration führt (Romero et al. 2006).

Dies hat zur Folge, dass aus dem entstandenen L-Arginin eher NO durch eNOS als Ornithin durch die Arginase gebildet wird. Dieser Effekt kann noch dadurch gesteigert werden, dass L-Citrullin ein nichtkompetitiver Arginaseinhibitor ist (Shearer et al. 1997; Greenberg 1960; Romero et al. 2006). Eine Minderung des IR-Schadens in Magen und Niere konnte bereits gezeigt werden (Gou et al. 2011; Fu et al. 2013). Die NO-Produktion der iNOS bleibt durch L-Citrullin in Zellkultur zudem unbeeinflusst und ist dadurch zu erklären, dass NO in hohen Konzentrationen einen Cysteinrest der ASS S-nitrosyliert und das Enzym so hemmt, was mit einem verringerten Citrullinrecycling einhergeht (Romero et al. 2006; Hao et al. 2004). Allerdings wurde in mit proinflammatorischen Faktoren stimulierten Makrophagen ein erhöhtes Citrullin/Argininrecycling entdeckt, sodass die Aktivität dieses Regenerationszyklus offenbar von den gerade herrschenden Konditionen abhängig ist (Heneka et al. 1999). Auch die Plasmaargininkonzentration selbst wird durch L-Citrullin effektiver gesteigert als durch L-Arginin selbst, da es in der Niere in großen Mengen zu L-Arginin verstoffwechselt und dann freigesetzt wird (Khun et al. 2006; Romero et al. 2006).

Bei oraler Gabe von L-Citrullin ist daher zu erwarten, dass bei allen Erkrankungen, die mit einer verminderten L-Argininplasmakonzentration oder einer erhöhten Arginaseaktivität

einher gehen, die Plasmaargininkonzentration erfolgreich angehoben werden kann. Des Weiteren müsste L-Arginin bevorzugt durch die eNOS verstoffwechselt werden, da L-Citrullin *in vivo* über drei Mechanismen ihre L-Argininverfügbarkeit steigert:

1. Umwandlung zu L-Arginin nahe der eNOS durch die ASL
2. Erhöhung der Plasmaargininkonzentration und daher erhöhten Transport in die Caveolae
3. Arginaseinhibition und somit geringere Substratkonkurrenz

(Romero et al. 2006; Khun et al. 2006; Shearer et al. 1997; Greenberg 1960)

Durch die Arginaseinhibition würde zusätzlich die Synthese der Polyamine und des Prolins vermindert, was mit einem verminderten ventrikulären Remodeling einhergehen könnte (Djukova et al. 2014, Schreckenber et al. 2014; Li et al. 2000).

1.4. Ziel dieser Arbeit

Aus den genannten Gründen habe ich mich dazu entschlossen, die funktionellen Auswirkungen L-Citrullins auf das reperfundierte und normoxe Myokard der Ratte sowie das initiale Remodeling auf RNA- und Proteinebene *in vitro* zu analysieren. Die zentralen Fragestellungen dieser Arbeit lauten:

1. Steigert L-Citrullin die kardiale Kontraktilität?
 - a. Normoxie als physiologisches Modell
 - b. Ischämie-Reperfusion als Modell für Herzinsuffizienz und Arginaseinduktion
2. Erhöht L-Citrullin die postischämische NO-Bioverfügbarkeit?
3. Reduziert L-Citrullin die postischämische linksventrikuläre Superoxidbildung?
4. Wie beeinflusst L-Citrullin die frühe transkriptionelle Änderung wichtiger Markergene?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Versuchstiere

weibliche WISTAR-Ratten
Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle,
Frankreich

männliche WISTAR-Ratten
Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle,
Frankreich

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

96-well assay plate
Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Cryo-Röhrchen
Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Krokodilklemme
Hirschmann, Eberstadt

Kulturschalen 35 x 10 mm
Becton Dickinson, Heidelberg

Leinen-Operationszwirn
Gruschwitz, Neu-Ulm

Nylonnetz
NeoLab, Heidelberg

Pasteurpipetten
Brand, Wertheim

Pipetboy comfort IBS integra
Integra, Chur, Schweiz

Pipettenspitzen 10 ml
Greiner Bio-One, Kremsmünster,
Österreich

Pipettenspitzen 10-5000 µl
Sarstedt, Hamburg

Precell-Röhrchen
Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Reaktionsgefäße 0,5; 1,5; 2 ml
Sarstedt, Nümbrecht

Präparationsbesteck
Aesculab, Heidelberg

Reaktionsgefäß 15 ml
Becton Dickinson, Heidelberg

Reaktionsgefäß 50 ml
Greiner Bio-One, Kremsmünster,
Österreich

Material und Methoden

Reaktionsgefäß lichtgeschützt	Eppendorf, Hamburg
Rasierklingen	Wilkinson, Solingen
PCR-Reaktionsgefäß PP natur 0,2 ml	Nerbepius, Winsen/Luhe
Filterpapier	Biotech-Fischer, Reiskirchen
NuPAGE 10 % Bis-Tris Gel, 15 Wells	Novex, Carlsbad, Kalifornien, USA
Protran Nitrocellulose	Whatman GmbH, Dassel
Transfer Membrane, Porengröße 0,45 µm	

Objektträger	Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, USA
--------------	--

Tissue Tek	Science Services, München
------------	---------------------------

2.1.3.Reagenzien/ Chemikalien, Laborbedarf

2.1.3.1. Allgemeinbedarf

Flüssiger Stickstoff	Merck, Darmstadt
Glaswaren	Hirschmann, Eberstadt
Parafilm	Pechiney Plastic Packing, Chicago, USA
PBS	Bioline, London, Vereinigtes Königreich
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Skalpell	Feather, Osaka, Japan
Steriles Wasser	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Hamiltonspritze	Hamilton, Höchst
Spatel	Aesculab, Heidelberg
Schwämme (sponge pad for blotting)	Invitrogen, Karlsruhe
Zellschaber (Cell scraper)	Sarstedt, Nümbrecht

Material und Methoden

2.1.3.2. Chemikalien/ Reagenzien

Benzonase	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Albumin Fraktion V)	Roth, Karlsruhe
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Merck, Darmstadt
CaCl ₂	Roth, Karlsruhe
Carbogen	Danbury, Connecticut, USA
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Cytosin-Arabinofuranosid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako, Golstrup, Dänemark
DHE	Thermo Scientific, Rockford, USA
DTT	Appllichem, Darmstadt
DTT	Invitrogen, Karlsruhe
ECL-Lösung (SuperSignal West Pico Solution: a) stable Peroxide, b) Luminol/Enhancer Solution)	Thermo Scientific, Rockford, USA
FCS	PAA, Wien, Österreich
FS-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Hepes (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinen-thansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Glucose Monohydrat D+	Merck, Darmstadt
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Isopropanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Material und Methoden

Karnithin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
KCL	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Kollagenase	Worthington, Columbus, Ohio, USA
Kreatin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Laemmli-Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
L-Arginin	Merck, Darmstadt
L-Citrullin	Merck, Darmstadt
L-NAME	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
LysisBuffer Gewebe	CellSignaling, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ x 6H ₂ O	Merck, Darmstadt
MgSO ₄ x 7H ₂ O	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
M-MLV-Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Molekulargewichtsmarker (Spectra Multicolor Broad range Protein ladder)	Thermo Scientific, Rockford, USA
MOPS SDS Running Buffer	Novex, Carlsbad, Kalifornien, USA
NaCl	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt

Material und Methoden

Naphtylethylendiamin(NED)-Lösung	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Nitrit-Standard (0,1M)	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Nukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Transfer Buffer	Novex, Carlsbad, Kalifornien, USA
Oligo(dT) ₁₅	Invitrogen, Karlsruhe
M199 (Medium)	GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA
PBS	Bioline, London, Vereinigtes Königreich
Pen.-Strept.	ThermoFisher Scientific (Gibco), Waltham, Massachusetts, USA
PeqGOLD TriFAST	Peqlab, Erlangen
Phosphataseinhibitor	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Pinzette	Aesculab, Heidelberg
PMSF	ThermoFisher Scientific Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Primer	Invitrogen, Karlsruhe
Proteaseinhibitor	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
RNAse Inhibitor	Promega, Madison, USA
RNAse	Applichem, Darmstadt
Steriles Wasser	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sulfonamid-Lösung	Promega, Madison, Wisconsin, USA
SYPR-Green Supermix	Bio-Rad, München
Taurin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
TBS	AppliChem, Darmstadt

Material und Methoden

Trockeneis	Merck, Darmstadt
Tween	AppliChem, Darmstadt
<u>2.1.4. Geräte:</u>	
Airflow Control	Köttermann, Uetze
Allegra 25 R Kühlzentrifuge	Beckman Coulter, Fullerton USA
Aqualine AL 18 (Wärmebecken)	Lauda, Lauda-Königshofen
Beckman Coulter Allegra 21 Zentrifuge	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Digitale Analysewaage	Kern und Sohn, Balingen
DRI-Block DB 20	Techne, Stone, UK
Dunkelkammer mit Kamera	Vilber, Eberhardzell
Fireboy	Integra, Biebertal
Gewebehacker	Mickle laboratory Engineering Company, Guildford, UK
Heizrührer	Jahnke und Kunkel, Staufen
Icematic	Castel Mac, Castelfranco, Italien
iCycler	Bio-Rad, München
Inkubator (unbefeuchtet)	Memmert, Schwabach
Inkubator (befeuchtet)	Heraeus, Hanau
Interface	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Konfokales Mikroskop (LSM 510 META)	Carl Zeiss, Jena
Kühlschrank -20	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlschrank -4	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlschrank -80 (Ultra low)	Sanyo, Moriguchi, Japan

Material und Methoden

Langendorff-Apparatur	Eigenbau des physiologischen Instituts der JLU Gießen
Life Technologies PS 608 Elektrophoresis Power supply	Apelex, Lisses, Schweiz
Microfuge 18 Centrifuge	Beckman, Fullerton, USA
Mikroskop	Nikon, Tokyo, Japan
Mikroskop	Olympus, Tokio, Japan
Mikrotom	Leica, Nußloch
Monitor	Philips, Köln
MS-2-Minishaker	IKA, Staufen
ND1000	Peqlab, Erlangen
Oszillograph	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Plate reader	Tecan, Männedorf, Schweiz
Precellys 24	peQlab, Erlangen
Schüttler	Biometra, Göttingen
Sterilbank (HeraSafe)	Heraeus, Hanau
Stimulator	Eigenbau des physiologischen Instituts der JLU Gießen
Thermalcycler Cyclogene	Techne, Burlington USA
UP 100 H	Hielscher Ultrasound technology, Teltow
UV-Stratalinker 2400	Stratagen, Heidelberg
Waage	Sartorius, Guxhagen
Wasser Demineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn
X Cell II Blot Modul	Invitrogen, Karlsruhe

Material und Methoden

X Cell SureLock Electrophoresis Cell Invitrogen, Karlsruhe

2.1.5. Software

ChemiCapt 5000 Vilber, Eberhardzell

iCycler™ iQ Optical System Software Bio-Rad, München

ImageJ Wayne Rasband (National Institutes
of Health), Bethesda, USA

Microsoft Excel 2010 Microsoft, Redmont, USA

Microsoft Word 2010 Microsoft, Redmont, USA

ND-100 Peqlab, Erlangen

Quantity ONE BioRad, München

SPSS 22 Statistics SPSS, München

2.1.6. Antikörper

ADM2: rabbit, polyklonaler IgG, 1 mg/ml, 1:500 in 5 % Milchpulver, 40 kDa, Bioss,
Woburn, USA

Arginase I (H-52): sc-20150, rabbit, polyklonaler IgG, 200 µg/ml, 1:200 in 5 % BSA, 35 kDa,
Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA

Arginase II (H-64): sc-20151, rabbit, polyklonaler IgG, 200 µg/ml, 1:200 in 5 % BSA, 40
kDa, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA

Donkey anti-goat IgG-HRP: donkey, polyklonaler IgG, 1:2000 in 5 % BSA,
Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, USA

GAPDH: rabbit, polyklonaler IgG, 6,2 mg/ml, 1:4000 in 5 % BSA, 37 kDa, Calbiochem,
Darmstadt

Goat Anti mouse-HRP: goat, polyklonaler IgG, 1 mg/ml, 1:2000 in 5 % BSA,
Affnity Biologicals, Ancaster, Kanada

SERCA2 (C-20): sc-8094, goat, polyclonaler IgG, 200 µg/ml, 1:200 in 5 % BSA; 92 kDa,
Santa Cruz Biotechnology

Sheep anti-rabbit-HRP: sheep, polyklonaler IgG, 1 mg/ml, 1:2000 in 5 % BSA/ Milchpulver,
Affnity Biologicals, Ancaster, Kanada

2.2 Puffer und Medien

Ausplattiermedium = Waschmedium (26,52 ml):

26 ml CCT Medium: sterilfiltriert

- 2 Pack M199
 - 5 mM Kreatin
 - 2 mM Karnitin
 - 10 µM Cytosin-Arabinofuranosid
 - 5 mM Taurin
- pH = 7,4

520 µl Pen.-Strept (2 %)

Kollagenaselösung:

25 mg Kollagenase

5 ml Perfusionslösung

12,5 µl CaCl₂ (100 mM)

Powell-Medium:

110 mM NaCl

2,5 mM KCl

1,2 mM KH_2PO_4

1,2 mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

25 mM Hepes 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinen-ethansulfonsäure

10,0 mM Glucose Monohydrat D+

Mit 2 M NaOH auf pH 7,4 einstellen

Vorplattiermedium (53ml):

50 ml CCT Medium

2 ml FCS

1 ml Pen.-Strept.

Modifizierte Krebs-Henseleit-Puffer (mKHP):

140 mM NaCl

2,7 mM KCl

0,4 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

1,0 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

5,0 mM Glucose

1,8 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

24 mM NaHCO_3

cDNA-Mix (5 μ l):

2 μ l 5 x RT-Puffer

0,5 μ l DTT

1 μ l Nukleotide

(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

1 μ l Oligo(dT)₁₅

0,3 μ l M-MLV-Reverse Transkriptase

0,2 μ l RNase Inhibitor

PCR-Mix (17 μ l):

10 μ l SYBR-Green Supermix

0,6 μ l Primer

6,4 μ l Steriles Wasser

1 x Laufpuffer: 1 l enthält:

50 ml 20 x MOPS SDS Running Puffer

950 ml steriles Wasser

Für obere Kammer:

200 ml 1 x Laufpuffer

500 μ l NuPAGE Antioxidant

Transferpuffer: 1 ml enthält:

50 ml NuPAGE Transfer Buffer 20 x

1 ml NuPAGE Antioxidant

200 ml Methanol

749 ml steriles Wasser

2.3. Methoden

2.3.1. Zellkultur

Um die funktionelle Auswirkung Citrullins auf isolierte Kardiomyozyten zu erfassen, wurden diese isoliert, kultiviert und im elektrischen Feld stimuliert.

2.3.1.1. *Kardiomyozytenisolation*

Für die Isolation der Kardiomyozyten wurden Herzen aus drei Monate alten männlichen WISTAR-Ratten präpariert (siehe Präparation Langendorff-Perfusion) und im Anschluss retrograd in einem eigens hierfür vorhandenen Langendorff-System der Marke Eigenbau des physiologischen Instituts der JLU Gießen perfundiert. Vor der Präparation wurde das Langendorff-System mit Aqua bidest und anschließend Powell-Medium gespült. Die Perfusion selbst erfolgte zunächst mit 8 ml 37 °C warmem, Carbogen begastem und nicht rezikulierendem Powell-Medium für 5 min, um das noch im Herzen befindliche Blut auszuwaschen. Im Anschluss wurde das Herz einer Kollagenaseverdau (25-minütige Perfusion mit 37 °C warmer und Carbogen begasteter Kollagenaselösung) unterzogen. Nach Elimination der meisten bindegewebigen Bestandteile wurden Vorhöfe sowie die großen herznahen Gefäße entfernt und die Zellen mit einem Zellschneider bei einer Schnittbreite von 700 µm sowie per Hand mit zwei Skalpellern zerkleinert. Der entstandene „Zellbrei“ wurde zum Nachverdauen mit 12 ml Kollagenaselösung für fünf Minuten in ein 50 ml Falcon überführt und dabei mit einer 10 ml-Pipette einmal pro Minute resuspendiert.

Anschließend folgte die Filtration durch ein Nylonnetz mit 200 µm großen Poren sowie drei Zentrifugationsschritte (Raumtemperatur; 1.400 rpm, 3 min; 2.300 rpm, 2 min; 3.300 rpm, 1 min (Beckman Coulter Allegra 21, Rotor: S 4180)) bei denen jeweils mit dem Sediment weiter gearbeitet wurde. Zwischen den Zentrifugationsschritten wurden die Kardiomyozyten langsam wieder an physiologische Kalziumkonzentrationen gewöhnt. Hierfür sind die Zellen nach der ersten Zentrifugation in 10 ml Powell-Medium + 200 µmol/l CaCl₂ und nach der zweiten Zentrifugation in Powell-Medium + 400 µmol/l CaCl₂ + 4 % Albumin aufgenommen worden. Nach der dritten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und mit dem Sediment Zellkulturen, die größtenteils aus intakten Kardiomyozyten bestanden, hergestellt.

2.3.1.2. Zellkultivierung

Damit die intakten Kardiomyozyten an den Zellschalen adhäreren können, wurden diese mit FCS-haltigem Vorplattier-Medium für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die isolierten Herzmuskelzellen wurden nun in 25 ml CCT-Medium pro Herz gelöst und nach Absaugen des Vorplattiermediums gleichmäßig auf die Zellschalen verteilt und bei 37°C für 2 h CO₂-frei inkubiert. Da nur die intakten Zellen in diesen zwei Stunden adhäreren, konnten die übrigen Bestandteile durch Entnahme des CCT-Mediums sowie das Waschen entfernt werden. Am Ende wurden die Kulturen mit einem Milliliter CCT-Medium sowie darin gelöstem L-Citrullin und L-NAME für 3 h bei 37 °C inkubiert.

2.3.1.3. Messung kontraktile Parameter im elektrischen Feld

Die Messung kontraktile Parameter im elektrischen Feld an isolierten Kardiomyozyten wurde dazu verwendet, um die direkte Wirkung L-Citrullins auf normoxe Herzmuskelzellen zu charakterisieren, und erfolgte mit folgenden Gruppen:

1. 3 h Inkubation mit CCT-Medium: 3 h Kontrolle (3hK)
2. 3 h Inkubation mit CCT-Medium + 100 µM L-Citrullin: 3 h L-Citrullin (3hC)
3. 3 h Inkubation mit CCT-Medium + 100 µM L-Citrullin + 100 µM L-NAME: 3 h L-Citrullin+ L-NAME (3hC + L-N)
4. 3h Inkubation mit CCT-Medium + 100 µM L-NAME: 3h L-NAME (3hL-N)

Die Kulturschalen mit den darin befindlichen Zellen wurden auf den Objektisch des Mikroskops gestellt und mit einem speziellen Deckel abgedeckt. In diesem Deckel befinden sich zwei Platindrähte, die als Kathode und Anode fungieren und in das Medium eintauchen. Die Stimulation der Herzmuskelzellen erfolgte mit einer biphasischen Rechtecksspannung, die eine Amplitude von 5V und eine Frequenz von 2 Hz aufweist und quasi ein homogenes elektrisches Feld erzeugt.

Um die verwendete Methode nachvollziehen zu können, soll an dieser Stelle kurz auf den Versuchsaufbau eingegangen werden. Mit dem Mikroskop waren sowohl eine Zeilenkamera für Hell-Dunkel-Kontraste, als auch eine Videokamera zur Darstellung des Bildes auf dem Monitor verbunden. Dreht man die beiden Kameras parallel zur Längsachse der Kardiomyozyten kann deren Kontraktionsverhalten erfasst werden, indem die Zeilenkamera die Hell-Dunkelkontraste (also die Zellgrenzen) in elektrische Signale umwandelte und diese mit einer vertikalen Auslenkung auf einem Zweizeilenoszillographen sichtbar macht.

Damit die Änderung der Zelllänge in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet werden kann, müssen die Zellgrenzen erkannt werden. Hierfür lag am zweiten Kanal des Oszillographen eine feste Spannung an, die über das Potentiometer des Interface angesteuert werden konnte. Dies ist als horizontale Bewegung einer Markierung auf dem Oszillographen sichtbar. Diese Markierung wurde nun vor die stärkste vertikale Auslenkung (den Zellrand) geschoben, um die Zellgrenzen festzulegen. Erreichte nun die Spannung des Zellbildes den durch die Markierung vorgegebenen Wert, kann die Interfacespannung aufgezeichnet werden. Durch die Kontraktion und Relaxation der Zellen verschieben sich die vertikalen Auslenkungen (Zellgrenzen) auf dem Oszillographen und damit die Stelle, an der die Interfacespannung erreicht wird. Das ermöglicht, die Längenänderung gegen die Zeit aufzuzeichnen.

Die so ermittelten Daten wurden mit dem Programm *Mucell* erfasst.

Während des gesamten Messvorgangs wurden folgende Parameter gemessen oder berechnet:

1. LDiast: maximale Zelllänge (μm)
2. TTP (Time to Peak): Zeitdifferenz von Beginn der Kontraktion bis zum Maximum (ms)
3. TTP 50 %: Zeitdifferenz von der 50 %igen Kontraktion bis zum Maximum (ms)
4. Amplitude: maximale Zellverkürzung (μm)
5. R 50 %: Zeitdifferenz vom Beginn der Relaxation bis zur 50 %igen Relaxation
6. CV (Contraction Velocity): die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)
7. RV (Relaxation Velocity): die maximale Relaxationsgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)
8. dL/L %: $(1 - \frac{\text{minimale Zelllänge}}{\text{maximale Zelllänge}}) \times 100 \%$

Für die Auswertung wurde sich aus Gründen der Übersichtlichkeit auf die physiologisch wichtigsten Kontraktionsparameter (LDiast, dL/L %) fokussiert.

2.3.2. Langendorff-Perfusion

Um *in vitro* die Herzfunktion ermitteln zu können, wurde eine retrograde Perfusion nach Langendorff durchgeführt.

2.3.2.1. Versuchstiere und Präparation

Für alle Versuche wurden drei Monate alte, weibliche WISTAR-Ratten verwendet, die im Tierstall des physiologischen Instituts unter Zugang zu normaler Nahrung gehalten wurden. Alle Tiere sind vor Versuchsbeginn gewogen worden. Da die Langendorff-Perfusion in Doppelversuchen erfolgte, fand der hier beschriebene Vorgang immer parallel an zwei Herzen statt. Vor der Präparation wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Nach der Tiertötung erfolgte die rasche Eröffnung des Abdomens direkt unterhalb des Zwerchfells. Um einen Zugang zum Thorax zu gewährleisten, wurde das Zwerchfell durchtrennt und im Anschluss das Herzlungenpaket entnommen. Im nächsten Schritt ist zur Verlangsamung des Stoffwechsels und zur Schonung des Herzgewebes das entnommene Gewebe in 4 °C kalte Kochsalzlösung überführt und Lunge sowie Thymus vom Herzen getrennt worden. Vor dem Einhängen in das Perfusionssystem wurden die Pulmonalvenen möglichst proximal und die Aorta zwischen A. Carotis und A. Subclavia sinistra durchtrennt. Nach der Präparation wurde das Herz retrograd in die Wärmekammer (37 °C) des Langendorff-Systems eingehängt und an der kanülierten Aorta ascendens fixiert.

2.3.2.2. Retrograde Perfusion und Versuchsprotokolle

Nach der Fixation beider Herzen wurde mit der Perfusion begonnen. Hierzu wurde ein Langendorff-Perfusionssystem der Marke Eigenbau des physiologischen Instituts der JLU Gießen verwendet. Das System besteht aus einem äußeren und einem inneren Kreislauf. Der äußere Kreislauf umspült die innere Zirkulation mit 37 °C warmem Wasser, um eine physiologische Körperkerntemperatur zu simulieren. Der innere Kreislauf dient der Perfusion des Herzens mit 37 °C warmem Henseleit-Puffer (siehe 2.2) und darin gelösten Pharmaka. Der Puffer wird zur Sauerstoffsättigung mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast. Um linksventrikuläre Drücke und Herzfrequenz messen zu können, wurde ein wassergefüllter Latexballon, der mit einem Drucksensor in Verbindung stand, in den linken Ventrikel eingeführt und sein Innendruck solange erhöht bis sich diastolische Drücke von 10 mmHg einstellten. Im Folgenden wurde ein Fluss von 8 – 10 ml/min so gewählt, dass sich für den Aortendruck Werte von ca. 50 mmHg ergaben. Im weiteren Verlauf wurde der Fluss nicht mehr verändert, sodass lediglich Herzfrequenz und die gemessenen Drücke sich als Maß für die Herzfunktion ändern konnten (flusskonstante Perfusion). Während des Versuchs wurden die folgenden Parameter kontinuierlich gemessen oder berechnet und alle 15 min erfasst:

Material und Methoden

Systolischer Druck (mmHg)	SysD
Diastolischer Druck (mmHg)	DiasD
Herzfrequenz (BPM)	HF
Aortendruck (mmHg)	AD
Fluss (ml/min)	F
SysD - DiasD (mmHg)	LVDP
HF x LVDP (mmHg x BPM/1000)	RPP
Maximale Druckentwicklung/s (mmHg/s)	dP/dt max
Maximaler Druckabfall/s (mmHg/s)	dP/dt min
Koronarer Widerstand(mmHg x min/ml)	CR

Alle Versuchsprotokolle wurden nach einem festen Schema durchgeführt. Zunächst begann die Perfusion mit einer ca. 20-minütigen Stabilisationsphase, in der sich eine konstante Herzfunktion einstellte. Im Anschluss folgten eine 45-minütige Globalischämie sowie eine dreistündige Reperfusion. Sowohl während der Stabilisationsphase als auch drei und fünf Minuten nach Ende der Ischämie wurden jeweils zwei Milliliter Perfusat entnommen. Dieses Standardprotokoll (IR) kann durch gezielte Applikation von Pharmaka modifiziert werden.

Um die Wirkung von L-Citrullin auf das reperfundierte Myokard beschreiben zu können, wurden sieben Versuchsprotokolle befolgt:

1. Normoxie Kontrolle (Nx):
20 min Stabilisation → 3 h normoxe Perfusion; n = 8
2. IR-Kontrolle (IR):
20 min Stabilisation → 45 min Globalischämie → 3 h Reperfusion; n = 8
3. Präischämische Gabe von 100 µM L-Citrullin (Cprä):
Einwaschen von L-Citrullin 5 min vor Ischämie und Applikation bis zum Versuchsende;
20 min Stabilisation → 45 min Globalischämie → 3h Reperfusion; n = 7

4. Postischämische Gabe von 100 μM L-Citrullin (Cpost):
20 min Stabilisation \rightarrow 45 min Globalischämie \rightarrow 3h Reperfusion + 100 μM L-Citrullin; n = 7
5. Postischämische Gabe von 100 μM L-NAME (L-NAME) :
20 min Stabilisation \rightarrow 45 min Globalischämie \rightarrow 3 h Reperfusion \rightarrow 100 μM L-NAME; n = 6
6. Postischämische Gabe von 100 μM L-NAME + 100 μM L-Citrullin (L-NAME + Cp):
20 min Stabilisation \rightarrow 45 min Globalischämie \rightarrow 3 h Reperfusion + 100 μM L-NAME + 100 μM L-Citrullin; n = 6
7. Postischämische Gabe von 100 μM L-Arginin (L-Arg) :
20 min Stabilisation \rightarrow 45 min Globalischämie \rightarrow 3 h Reperfusion + 100 μM L-Arginin; n = 6

2.3.2.3. Auswertung

Für die Auswertung wurden die postischämischen auf die präischämischen Daten normiert und anteilig zur präischämischen Leistung in Prozent angegeben. Eine Ausnahme stellt der koronare Widerstand dar, der zusätzlich auf das Herzgewicht normiert wurde.

Um die Akutwirkung L-Citrullins auf das normoxe Herz beschreiben zu können, wurde auf die Gruppen Cprä und IR zurückgegriffen. Bei beiden Gruppen wurden jeweils Daten 10, 5 und 0 min vor der Ischämie aufgezeichnet. Da in einer Versuchsgruppe L-Citrullin fünf Minuten vor der Ischämie eingewaschen wurde, stellten die direkt vor der Ischämie erhobenen Daten den Akuteffekt L-Citrullins auf das normoxe Herz dar. Für die Darstellung der Ergebnisse wurden die Daten, die 0 min vor der Ischämie aufgezeichnet wurden, auf die fünf Minuten davor registrierten Werte für die Gruppen IR und Cprä normiert und in Prozent der vorherigen Leistung angegeben.

2.3.2.4. Weiterverarbeitung der Proben

Um die Proben auf neue Versuche vorzubereiten, wurde der LV vom RV getrennt und in Cryo-Röhrchen gegeben. Im Anschluss wurden die verpackten Proben umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei -80°C .

2.3.3. Nitritmessung:

Nitrit stellt gemeinsam mit Nitrat ein stabiles Endprodukt des NO-Stoffwechsels dar und eignet sich daher zur Abschätzung der gebildeten Menge Stickstoffmonoxids. Um die Nitritkonzentration zu bestimmen, wurde auf die Griess-Reaktion zurückgegriffen, bei der Nitrit mit dem im Griess-Reagenz enthaltenen Sulfanilamid zu einem Diazoniumsalz reagiert. Das Diazoniumsalz bildet mit Naphtylethylendiamin (NED) eine Azoverbindung mit einem Absorptionsmaximum von 546 nm. Aus der Absorption der Proben wird die Nitritkonzentration berechnet.

Zur Durchführung wurde 100 µl der Perfusate mit Zentricons durch einen Microfilter (10000 Dalton große Poren) filtriert, um Kontamination mit großen Proteinen zu vermeiden. Für die Nitrit-Bestimmung wurde ein *Griess-Reaction System* der Firma Promega verwendet und streng nach Herstellerangaben vorgegangen.

Zunächst wurde für die Standardkurve mit dem Nitrit-Standard und modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer 1 ml einer 100 µM Nitritlösung hergestellt. Aus dieser Lösung wurde eine Standardkurve in Dreifachbestimmungen mit den Konzentrationen 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,13 µM und 1,56 µM ermittelt. Für die Nitritbestimmung wurden 50 µl der Proben in Doppelbestimmung in die 96-well flat-bottom enzymatic assay plate gegeben und dann mit 50 µl Sulfanilamid-Lösung versehen. Nach 5 min Inkubation wurde die NED-Lösung dazu gegeben und 5min lichtgeschützt inkubiert. Die sequenzielle Gabe von NED und Sulfonamid erhöht die Sensitivität des Verfahrens. Innerhalb der nächsten 20 min wurde die Absorption zwischen 520 und 550 nm gemessen. Alle Lösungen hatten bei Verwendung Raumtemperatur.

2.3.4. Quantifizierung der Superoxidbildung

Um die entstandene Menge Superoxid im LV sichtbar zu machen, wurde eine Dihydroethidiumbromid-Färbung (DHE-Färbung) durchgeführt. Dieser Farbstoff wird durch Sauerstoffradikale zu Ethidiumbromid oxidiert. Ethidiumbromid ist selbstfluoreszierend und interkaliert mit der DNA, sodass die Intensitätssignalstärke der gefärbten Zellkerne als Maß für die Entstehung von Sauerstoffradikalen verwendet werden kann. Da diese Reaktion mit dem Superoxidanion (O_2^-) deutlich schneller abläuft als mit anderen Sauerstoffradikalen, ist die Färbung im Wesentlichen ein Maß für die entstandene Menge O_2^- .

Für die DHE-Färbung wurden jeweils zwei linke Ventrikel der Gruppen IR, Cpost, L-NAME und L-NAME + Cpost, die sich in Cryo-Röhrchen befanden, rekrutiert. Diese Cryo-Röhrchen lagerten während der Vorbereitung der Proben in flüssigem Stickstoff. Ein Drittel der linken Ventrikel wurden auf einer Korkplatte mit TissueTek eingedeckt. Zum Verfestigen des Klebers wurden die Proben auf Trockeneis schnell abgekühlt. Im Anschluss wurden 10 µm dicke Kryo-Schnitte bei -30 °C angefertigt und auf Objektträger übertragen. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bis zum Beginn der Färbung bei -80° C.

Es wurden jeweils zwei Objektträger, die miteinander verglichen werden sollten (IR/Cp; L-NAME/L-NAME + Cp), parallel gefärbt. Hierbei wurde zunächst der DHE-Farbstoff 1:250 mit PBS verdünnt und gut gemischt. Im Anschluss wurden die Schnitte mit der angesetzten Lösung bedeckt und für fünf Minuten bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert. Zum Abschluss wurden die Objektträger mit PBS gewaschen und mit *Mounting Medium* eingedeckt. Vor den Aufnahmen wurden die Proben bei Raumtemperatur lichtgeschützt 15 min gelagert.

Die Aufnahmen erfolgten am konfokalen Mikroskop (LSM 510 META), wobei mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Emission bei 540 nm gemessen wurde. Die Auswertung erfolgte mit *ImageJ*, wobei der Mittelwert der Fluoreszenzintensität das Maß für die gebildete Menge an Superoxidanionen war. Um dies direkt mit der IR-Kontrolle vergleichen zu können, wurden alle Werte auf den Median der zeitgleich gefärbten IR-Kontrolle normiert, sodass die Intensität relativ zur Kontrolle angegeben wird. Für die statistische Auswertung wurden aus den zwei biologischen Äquivalenten jeder Gruppe je vier Schnitte verwendet, sodass sich für die Stichprobengröße $n = 8$ ergab.

2.3.5. Expressionsanalyse auf RNA-Ebene

Für die qRT-PCR wurden alle Proben der Protokolle Nx, IR, Cpost, Cpost + L-NAME, L-NAME und L-Arg verwendet.

2.3.5.1. RNA-Isolation

Halbierte LV wurden in Precell-Röhrchen gegeben, mit einem Milliliter *TriFast* (enthält u.a. Phenol, Guanidiniumthiocyanat und 2-Mercaptoethanol) im *Precellys 24* lysiert und mit 200 µl Chloroform gemischt. Es folgte eine Zentrifugation (4 °C, 12500 rpm, 15 min (Beckman Coulter Allegra 25, Rotor: TA-15-1.5)) mit anschließender Entnahme der oberen Phase, die gemeinsam mit in gleichen Teilen dazugegebenem Isopropanol gevortext wurde.

Zum Ausfällen der RNA wurden die Proben über Nacht bei -20 °C gelagert und am nächsten Morgen erneut zentrifugiert (4 °C, 12500 rpm, 15 min (Beckman Coulter Allegra 25, Rotor: TA-15-1.5)). Das entstandene Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und wieder zentrifugiert (4 °C, 12500 rpm, 15 min (Beckman Coulter Allegra 25, Rotor: TA-15-1.5)). Zum Schluss wurde der Alkohol entsorgt, die Proben unter dem Abzug für eine Stunde getrocknet und in 50 µl sterilem Wasser gelöst.

2.3.5.2. Nano-Drop und cDNA-Synthese

Um die RNA-Konzentration photometrisch zu bestimmen, wurde mittels Nano-Drop die Absorption von 1,5 µl Probe bei 230 nm gemessen. Anschließend wurde die RNA mit doppelt destilliertem Wasser auf die gewünschte Konzentration (0,2 µg RNA/µl) verdünnt und direkt mit der cDNA-Synthese begonnen.

Die noch in den verdünnten RNA-Proben enthaltenen Proteine wurden für 15 min bei 60 °C denaturiert. Anschließend wurden die so behandelten Proben 1:1 mit cDNA-Reaktionsmix (siehe 2.2) versehen und im Thermalcycler revers transkribiert (1 h, 37 °C, Abbruch: 5 min 95 °C). Die entstandene cDNA ist mit sterilem DNase freiem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt und dann bei -20 °C gelagert worden.

2.3.5.3. qRT-PCR

Zur Quantifizierung der durch Citrullin bedingten Änderung der Genexpression auf Ebene der RNA stellte die qRT-PCR eine etablierte Methode dar.

Aus aufgetauten 1:10 verdünnten cDNA-Proben wurden jeweils drei µl in die PCR-Reaktionsgefäße pipettiert und mit 17 µl PCR-Mix (siehe 2.2) versehen. Als Fluoreszenzfarbstoff zur Bestimmung der cDNA-Konzentration wurde SYBR-Green verwendet. SYBR-Green bindet lediglich dsDNA, deren Konzentration sich nach jedem PCR-Zyklus (Denaturierung 95 °C, Annealing 50 – 65 °C, Elongation 72 °C) verdoppelt. Das Fluoreszenzsignal wird am Ende eines jeden Zyklus gemessen und ist somit proportional zur amplifizierten Menge cDNA.

Zur Kontrolle, ob es sich bei den entstandenen Produkten auch tatsächlich um die gewünschten Sequenzen handelt, wurden Schmelzkurven aufgezeichnet. Bei der Denaturierung werden die Einzelstränge voneinander getrennt, was mit einem Abfall des Fluoreszenzsignals einhergeht, da SYBR-Green nur dsDNA binden kann. Die Temperatur,

bei der dies geschieht, ist von der Länge des amplifizierten Genabschnitts und den Basenpaarungen abhängig und daher produktspezifisch.

Auswertung:

Zur Ermittlung der relativen Genexpression wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet. Dabei diente $\beta 2$ -Mikroglobulin (B2M) als Haushaltsgen. Alle Daten wurden auf die Nx-Kontrolle normiert.

Verwendete Primer:

Alle Primer wurden von Invitrogen, Karlsruhe, bezogen, nach Herstellerangaben gelöst und vor der Durchführung der qRT-PCR im Verhältnis 1:10 verdünnt. In Tabelle 1 werden die Forward-, die Reversesequenz und die Annealingtemperatur in C (T) angegeben.

Tab 1: Verwendete Primer:

Primer	Forward-Sequenz	Reverse-Sequenz	T
<u>B2M</u>	GCC GTC GTG CTT GCC ATT C	CTG AGG TGG GTG GAA CTG AGA C	65
<u>ANP:</u>	ATG GGC TCC TTC TCC ATC AC	TCT TCG GTA CCG GAA GCT G	58
<u>BNP:</u>	ATG ATT CTG CTC CTG CTT TTC C	TCT GCA TCG TGG ATT GTT CTG	58
<u>Arginase 1:</u>	GGA AGC ATC TCT GGC CAC GCC	CAC CGG TTG CCC GTG CAG AT	68
<u>Arginase 2:</u>	TGAGGAGCAGCGTCTCCC GT	GCTTCTCGGATGGCGGCT GG	62
<u>eNOS:</u>	AGC CCG GGA CTT CAT CAA TCA G	GCC CCA AAC ACC AGC TCA CTC TC	56
<u>iNOS:</u>	AAG AGA CGC ACA GGC AGA G	CAG CAG GCA CAC GCA ATG	60
<u>ODC:</u>	GAA GAT GAG TCA AAC GAG CA	AGT AGA TGT TTG GCC TCT GG	58

<u>SERCA2a:</u>	CGA GTT GAA CCT TCC CAC AA	AGG AGA TGA GGT AGC GGA TGA A	57
<u>IMD/ADM2</u>	TGC CTC AGG GTG GTG GCT CA	ACT GTG GGG GCT GCT GGG AT	64,5
<u>COI</u>	GCG AAC AAG GTG ACA GAG	CCA GGA GAA CCA GCA GAG	62
<u>COIII</u>	TGG AGT CGG AGG AAT G	GCC AGA TGG ACC AAT AG	49

2.3.6. Expressionsanalyse auf Proteinebene

Die Expressionsanalyse auf Proteinebene wurde mit vier Gruppen (IR; Cpost, L-NAME + Cp, L-NAME) à drei Herzen durchgeführt.

2.3.6.1. Aufbereitung des Herzgewebes

Für die Aufbereitung wurden 0,1 g der LV abgewogen, in Precell-Röhrchen gegeben und mit 500 µl fertigem Lysis Puffer (1 ml = 1 ml 1 x Cell Lysis Buffer, 10 µl 0,1 MPMSF) versehen. Im Anschluss wurden die Proben im *Precellys 24* für 2 x 20 s bei 6000 rpm homogenisiert und 10 min im Eis ruhen gelassen. Es folgte eine weitere Lyse mittels Ultraschall (UP100H; Cycle 0,7, Amplitude 60 %).

Im nächsten Schritt wurde bei 14.000 g, 4°C für 10 min zentrifugiert, der Überstand, in dem sich die Proteine befanden, entnommen und 1:50 mit sterilem Wasser verdünnt. 200 µl der verdünnten Proben konnten dann mit 80 µl Laemmli-Puffer (enthält unter anderem SDS, Mercaptoethanol, Glycerin) bei 95°C im Heizblock für fünf Minuten denaturiert werden. Das Natriumdodecylsulfat (SDS) dient zur Denaturierung und gleichmäßiger Beladung der Proteine mit negativen Ladungen, sodass sie in der Gelelektrophorese nach Größe getrennt werden können.

Das außerdem enthaltene Mercaptoethanol ist durch seine reduzierende Wirkung dazu in der Lage, Disulfidbrücken zu spalten, während Glycerol lediglich dem Beschweren der Proben dient. Die so behandelten Proben wurden entweder sofort für die SDS-Gelelektrophorese weiter verwendet oder bei -20 °C gelagert.

2.3.6.2. SDS-PAGE Gelelektrophorese

Um die Proteine der Größe nach aufzutrennen, erfolgte eine SDS-PAGE Gelelektrophorese mit 10 % Fertiggelen der Firma Novex. Da die Proteine durch SDS mit gleicher negativer Nettoladung versehen wurden, hing ihre Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld im Wesentlichen von ihrer Größe ab. Die von Laufpuffer umgebenen Gele wurden nun mit 10 µl jeder Probe und einem Marker für das Molekulargewicht beladen und bei 200 V für 50 min in der *Novex miniCell* laufen gelassen.

2.3.6.3. Western blot, Bildentwicklung und Auswertung

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die nach Größe getrennten Proteine bei 30 V für eine Stunde mit dem Transferpuffer im *XCell II blot Modul* auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Während dieses Vorgangs waren die innere Kammer mit Transferpuffer und die äußere Kammer zum Kühlen mit destilliertem Wasser gefüllt. Die nun mit Protein beladene Membran wurde mit sterilem Wasser gewaschen, je nach Antikörper mit in TBS gelöstem 5 % bovinem Serum Albumin (BSA) oder Milchpulver für eine Stunde geblockt und erneut mit sterilem Wasser gewaschen. War dieser Prozess beendet, wurden die Membranen über Nacht bei 4 °C zwischen zwei Filterpapieren gelagert und im Anschluss mit dem Erstantikörper inkubiert.

Um die Proteine spezifisch zu identifizieren, wurden sie mit einem in 5 % BSA oder Milchpulver gelöstem Erstantikörper (1. AK) für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgten drei Waschvorgänge à 10 min mit 1 x TBS + 0,1 % Tween20 (TBS-T) bevor die Inkubation mit dem Zweitantikörper (2. AK) begann. Hierfür wurde der Meerrettichperoxidase (Horse raddish peroxidase=HRP)-konjugierte 2. AK in 5 % BSA oder Milchpulver gelöst und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen à 10 min (zweimal mit 1 x TBS-T und einmal mit 1 x TBS). Im Materialteil befindet sich eine Übersicht zu den verwendeten Antikörpern.

Nach der Antikörperbindung wurden die Proteinbanden durch zweiminütige Inkubation mit Enhanced-Chemilumineszenz-Detektions-(ECL)-Lösung sichtbar gemacht. Hierbei wurde das in der ECL-Lösung enthaltene Luminol durch die HRP oxidiert. Das entstandene Produkt emittierte Licht bei einer Wellenlänge von 428 nm, das in der Dunkelkammer detektiert werden kann, um das gewünschte Protein als Bande sichtbar zu machen. Die Aufnahme des digitalen Bildes erfolgte mit *ChemiCapt* bei optimaler Belichtungszeit.

Für die Auswertung wurden die relativen Helligkeiten der einzelnen Proteinbanden mit *Quantity One* bestimmt, auf GAPDH bezogen und auf den Median der Kontrollgruppe (IR) normiert.

2.3.7. Statistische Auswertung

Alle Daten wurden mittels Kolmogorov-Smirnov- und Levene-Test auf Normalverteilung und Varianzgleichheit getestet. Liegt eine Normalverteilung vor, wurde für paarige Stichproben der Student-t-Test, für nicht paarige Stichproben eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Student-Newman-Keuls- (für gleiche Varianzen) oder Dunnett-T3-Test (für ungleiche Varianzen) verwendet, um die Daten auf Signifikanz zu prüfen. Für nicht normalverteilte Daten wurde bei paarigen Stichproben der Mann-Whitney-U-Test und bei nicht paarigen Stichproben der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Mann-Whitney-U-Test angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt und mit SPSS Statistics 22 für alle Daten berechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Kontraktionsverhalten isolierter normoxer Kardiomyozyten

3.1.1. Positiv inotrope Effekte L-Citrullins

Um die durch L-Citrullin bedingten Änderungen des Kontraktionsverhaltens isolierter Kardiomyozyten zu erfassen, wurden diese im elektrischen Feld stimuliert. Die folgenden zwei Versuchsgruppen dienten zur Beantwortung dieser Fragestellung:

1. 3 h Kontrolle
2. 3 h 100 μ M L-Citrullin

Unter L-Citrullin kann eine gesteigerte Kontraktilität der Kardiomyozyten beobachtet werden. Dies zeigt sich anhand einer, bei unveränderter Zelllänge, stärkeren Verkürzung der mit Citrullin behandelten Kardiomyozyten im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Fig. 5 und 6).



Fig. 5: Repräsentative Kontraktionszyklen nach 3 h. Es ist zu erkennen, dass Citrullin die relative Zellverkürzung steigert.

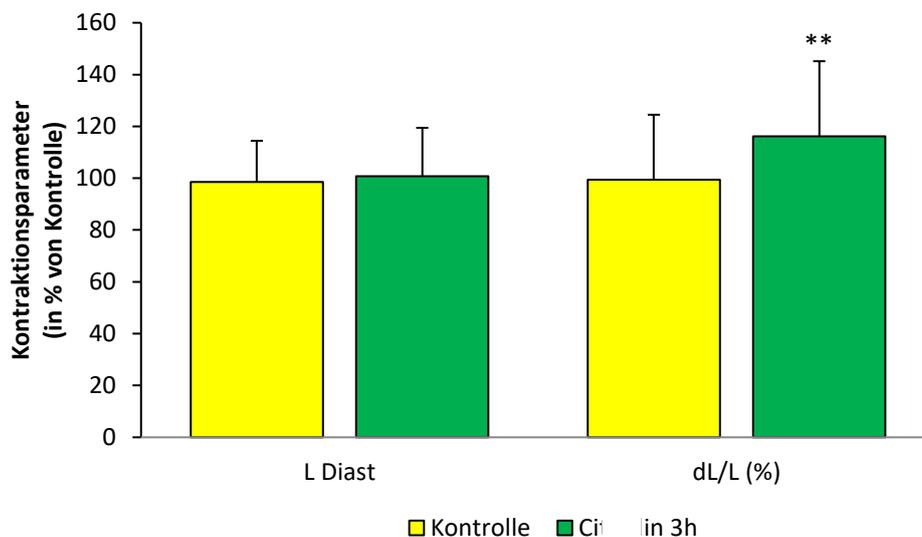


Fig. 6: Einfluss von L-Citrullin auf L Diast und dL/L %. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (δ). ** P < 0,01; n = 81.

3.1.2. NOS-Abhängigkeit der positiv inotropen Wirkung

Um zu prüfen, ob die Citrullin-vermittelten Effekte NOS-abhängig sind, wurde dieses Enzym mit L-NAME inhibiert. Die folgenden beiden Versuchsgruppen wurden hierfür verwendet:

1. 3 h L-NAME (100 μ M)
2. 3 h L-NAME+ L-Citrullin (beide 100 μ M)

Unter L-NAME ist Citrullin nicht dazu in der Lage, die Kontraktilität von Kardiomyozyten positiv inotrop zu beeinflussen. Es gibt bezüglich dL/L% und LDiaSt% keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Fig. 7 und 8).

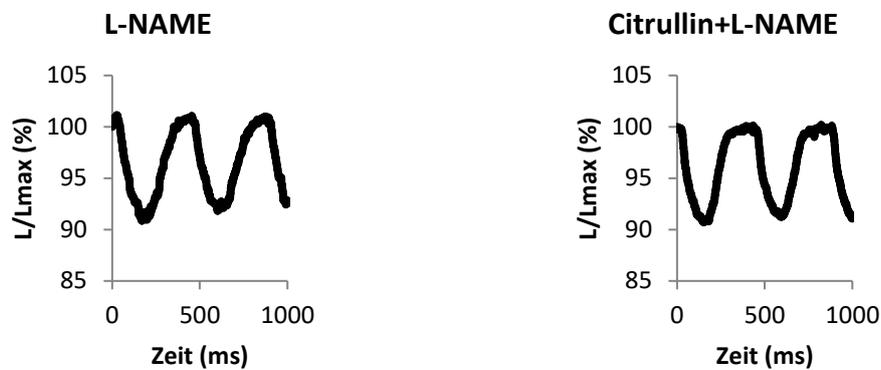


Fig. 7: Repräsentative Kontraktion nach 3 h L-NAME und Citrullin + L-NAME.

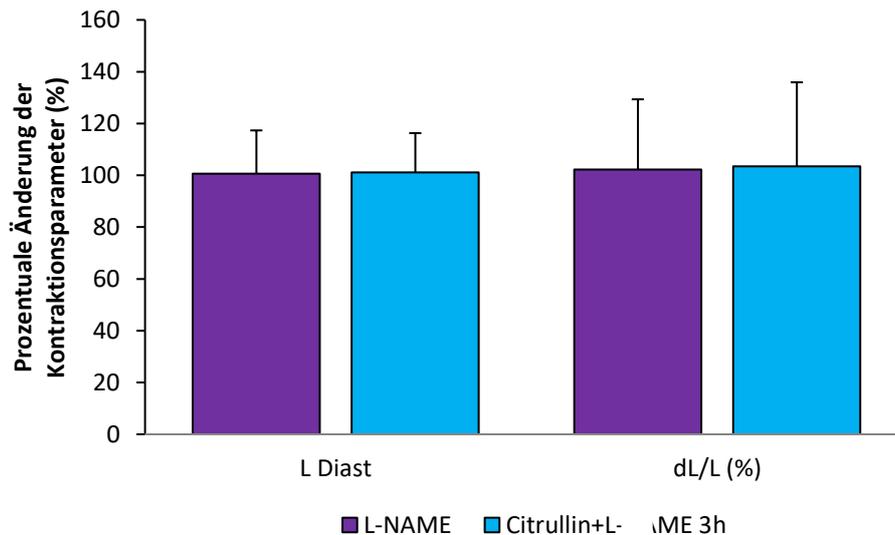


Fig 8: Relativer Einfluss von L-Citrullin auf L Diast und dL/L % unter L-NAME. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm \delta$. n = 81.

3.2. Herzfunktion *in vitro*

Um die linksventrikuläre Herzfunktion *in vitro* zu quantifizieren, wurde das etablierte Modell der Langendorff-Perfusion verwendet. Als Marker für die LV Funktion eignen sich vor allem das RPP und der LVDP.

3.2.1. Akute normoxe Wirkung L-Citrullins

Mit dieser Untersuchung am Langendorff-Modell sollte überprüft werden, ob die positiv inotropen Effekte Citrullins an isolierten Herzmuskelzellen auf das gesamte Herz übertragen werden können.

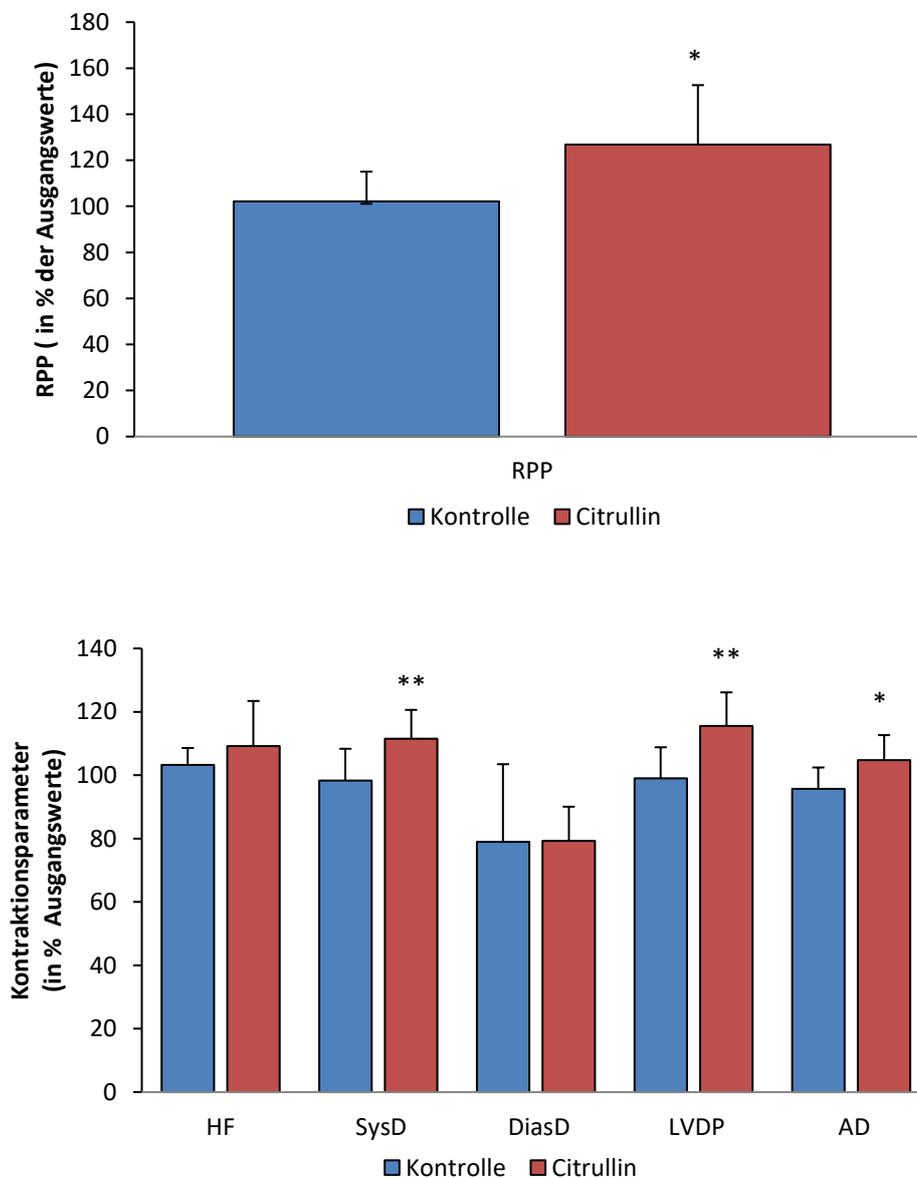


Fig. 9 und 10: **Akutwirkung L-Citrullins auf das normoxe Herz nach 5 min.** Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm \delta$. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; $n = 7 - 8$.

Ergebnisse

Nach der Gabe L-Citrullins ist unmittelbar ein Anstieg des RPPs um ca. 20 % gegenüber der Kontrolle zu verzeichnen. Die Steigerung des RPPs wird im Wesentlichen durch eine Erhöhung des SysD verursacht, während DiasD und HF unbeeinflusst bleiben. Außerdem ist ein moderater Anstieg des ADs nachweisbar (Fig. 9 und 10).

3.2.2. Funktionelle Auswirkungen des Infarkts als Modell des Arginindefizits

Um die funktionelle Auswirkung des Infarkts auf die isolierten Herzen darstellen zu können, wurden die Daten einer Infarktkontrolle mit der einer normoxen Kontrolle verglichen.

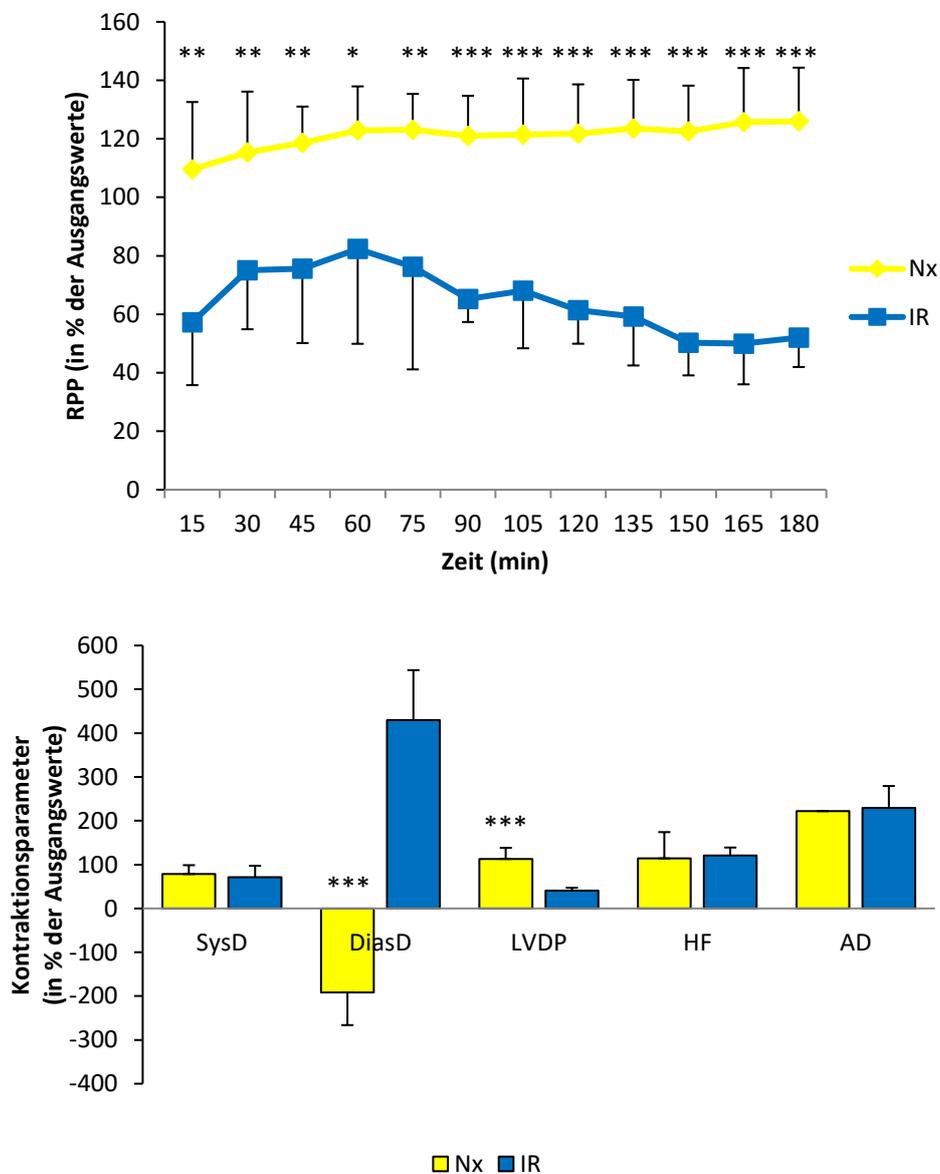


Fig. 11 und 12: Funktionelle Auswirkung des Infarkts. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm \delta$.
* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; $n = 8$.

1. Normoxie Kontrolle (Nx) (3 h Perfusion), n = 8 (gelb in den Abbildungen)
2. Ischämie-Reperfusion Kontrolle (IR) (Stabilisationsphase, 45 min Globalischämie, 3 h Reperfusion); n = 8 (blau in den Abbildungen)

Erwartungsgemäß zeigte sich ein Einbruch des RPPs als Maß für die Herzfunktion bei IR gegenüber der Nx (Fig. 11). Der Funktionseinbruch ist vor allem auf eine massive Steigerung des diastolischen Drucks nach der Ischämie und somit auf eine schlechtere Relaxation zurückzuführen. Alle anderen Parameter (SysD, AD, HF) blieben im Wesentlichen unbeeinflusst. Bei gleich bleibendem systolischen und erhöhtem diastolischen Druck nach Infarkt, ist auch die Differenz der beiden Drücke (LVDP) nach IR signifikant geringer als bei Nx (Fig. 12).

3.2.3. Beeinflussung der postischämischen Funktion durch L-Citrullin

Um den Einfluss Citrullins auf das reperfundierte Myokard zu quantifizieren, wurden drei Versuchsgruppen verwendet:

1. Eine IR-Kontrolle (IR) (Stabilisationsphase, 45 min Globalischämie, 3 h Reperfusion); n = 8 (blau in den Abbildungen)
2. IR + L-Citrullin präischämisch eingewaschen, Applikation bis Versuchsende; n = 8
3. IR + L-Citrullin postischämisch eingewaschen, Applikation bis Versuchsende (Cpost); n = 7 (grün in den Abbildungen)

Cprä beeinflusst keinen der funktionellen Parameter nach Ischämie (nicht gezeigt). Cpost verbessert über die komplette Zeitdauer der dreistündigen Reperfusion die Herzfunktion. Dies war sowohl anhand des RPPs (Fig. 13) als auch des LVDPs (LVDP (in % der Ausgangswerte nach 3h): IR: $40,8 \pm 6,9$; Cpost: $52,9 \pm 9,2$; $P < 0,05$) nachzuvollziehen. Der Effekt ist in der frühen Phase der Reperfusion besonders deutlich.

Die Steigerung des RPPs durch Cpost ist im Wesentlichen auf einen geringeren diastolischen Druck und somit auf eine bessere Relaxation des LVs zurückzuführen (Fig. 14). HF, AD und systolischer Druck sind unverändert (nicht gezeigt).

Ergebnisse

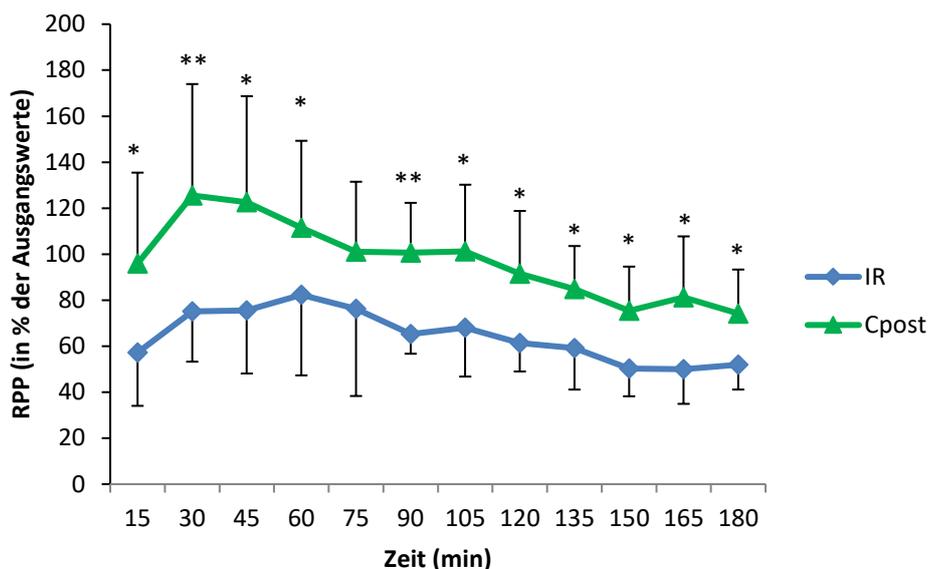


Fig. 13: RPP für die IR-Kontrolle und Cpost. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm \delta$. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; $n = 7 - 8$; * signifikant gegen IR.

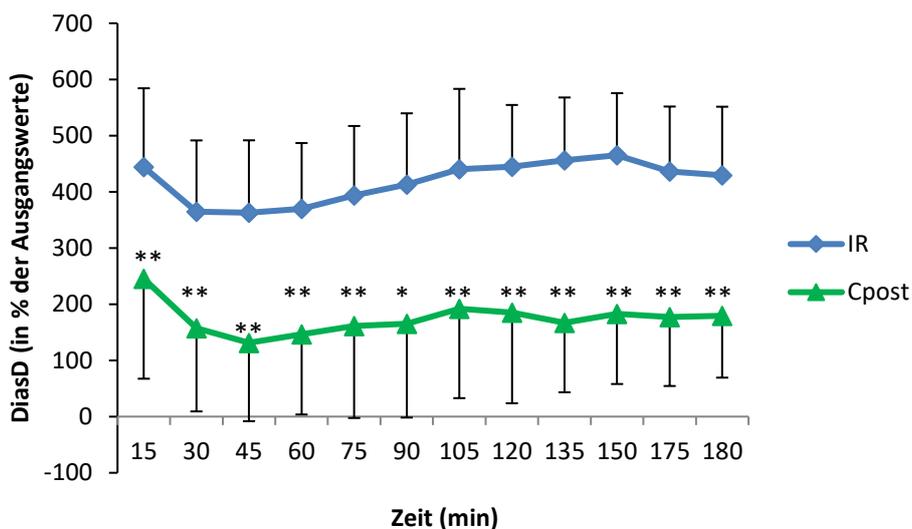


Fig. 14: DiasD für die IR und Cpost. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm \delta$. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; $n = 7 - 8$.

3.2.4. NOS-Abhängigkeit der postischämischen Funktionsverbesserung

Zur Prüfung der NOS-Abhängigkeit der postischämischen Funktionsverbesserung wurde das Enzym mit L-NAME inhibiert. Hierfür wurden vier Versuchsprotokolle befolgt:

1. IR (blau in den Abbildungen)

2. Cpost (grün in den Abbildungen)
3. IR + postischämische Applikation von L-NAME mit kontinuierlicher Gabe bis zum Versuchsende (= L-NAME); n = 6 (lila in den Abbildungen)
4. IR + postischämische Applikation von L-NAME + L-Citrullin mit kontinuierlicher Gabe bis zum Versuchsende (= L-NAME + Cp); n = 6 (hellblau in den Abbildungen)

Es ergibt sich eine nahezu totale Inhibition der L-Citrullin vermittelten Effekte. Wie bereits gezeigt steigt das RPP unter Citrullin nach 3 h Reperfusion signifikant an. Der Effekt kann durch zusätzliche Gabe von L-NAME aufgehoben werden (Fig. 15). Gleiches lässt sich auch für den LVDP beobachten (Fig. 16).

Darüber hinaus findet sich eine erhöhte Nitritkonzentration, ein stabiles Endprodukt des NO-Stoffwechsels, in den Perfusaten der mit Citrullin behandelten Herzen. Dieser Effekt kann durch NOS-Inhibition mit L-NAME aufgehoben werden (Fig. 17).

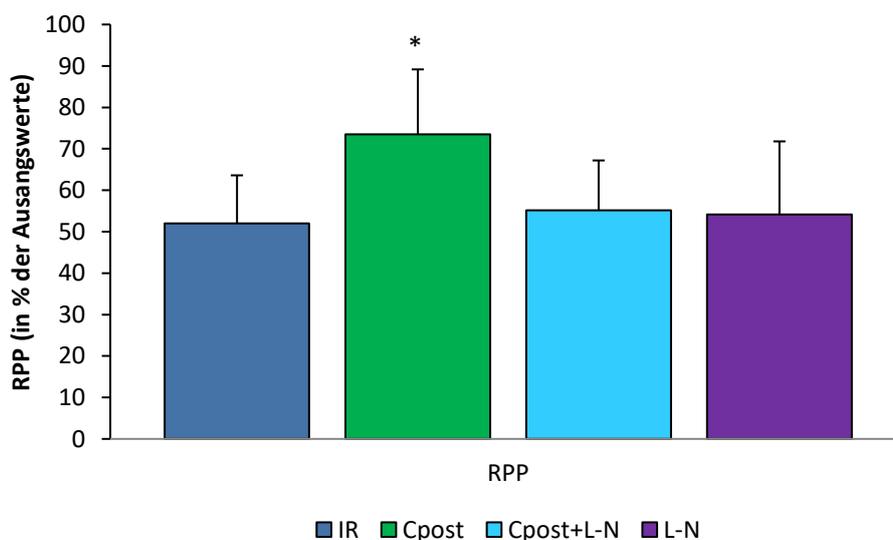


Fig. 15: RPP nach 3 h Reperfusion für IR, Cpost, L-NAME, L-NAME + Cp. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm \delta$. * P < 0,05; n = 6 – 8.

Ergebnisse

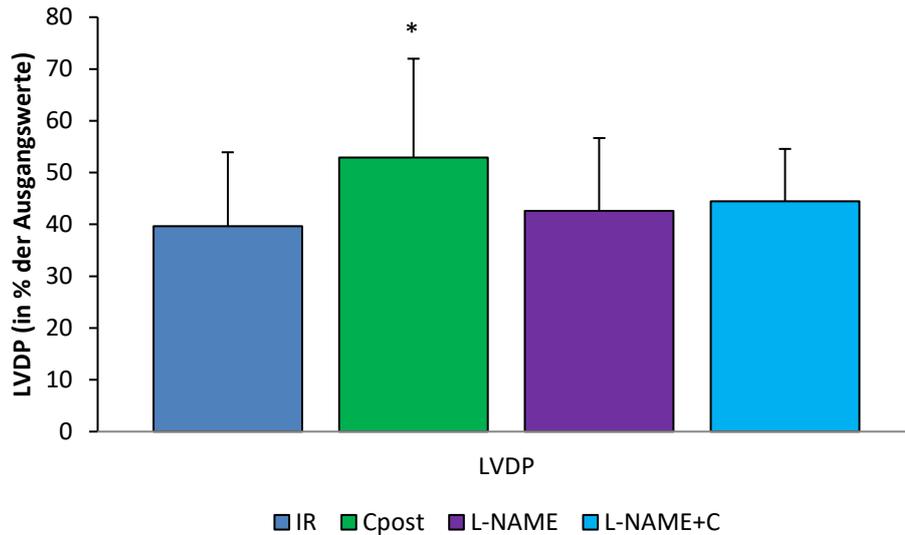


Fig. 16: LVDP nach 3 h Reperfusion für IR, Cpost, L-NAME, L-NAME + Cp. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm \delta$. * $P < 0,05$; $n = 6 - 8$.

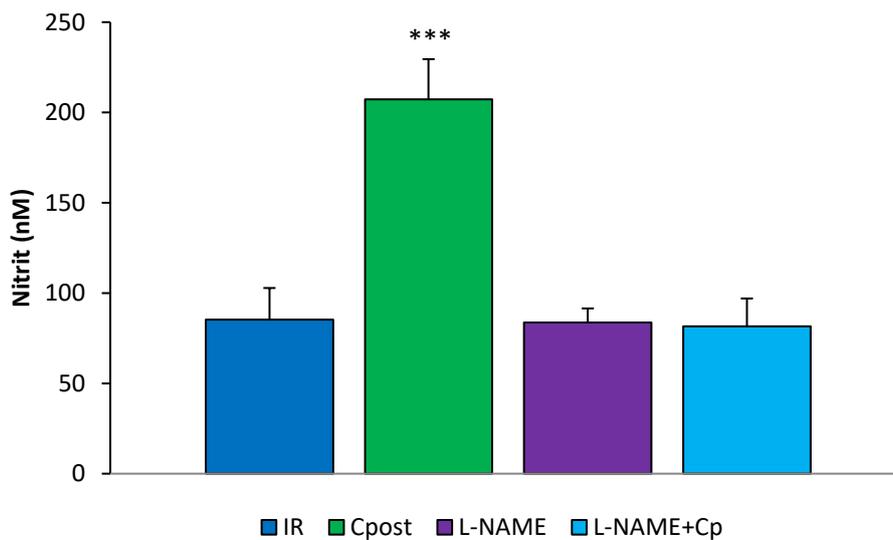


Fig. 17: Nitritkonzentration für IR, Cpost, L-NAME, L-NAME + Cp. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm \delta$. *** $P < 0,001$; $n = 6 - 8$.

3.2.5. Funktionelle Auswirkung L-Arginins:

Da durch L-Citrullin eine verbesserte postschämische Herzfunktion gezeigt werden kann, sollte diese mit den funktionellen Auswirkungen L-Arginins verglichen werden.

Hierfür wurden drei Versuchsprotokolle verwendet:

1. IR
2. Cpost
3. IR + L-Arginin postischämisch eingewaschen, Applikation bis Versuchsende (= Arg);
n = 7

Auch unter L-Arginin zeigt sich nach 3 h Reperfusion bezüglich des LVDP (LVDP (in % der Ausgangswerte): IR: $40,80 \pm 16,58$; L-Arg: $51,48 \pm 18,42$; $P < 0,05$; n = 7 - 8) und RPP (Fig. 18) in Tendenzen eine funktionell bessere Erholung als bei der IR-Kontrolle, die aber ein anderes Profil und eine geringere Signifikanz zeigt als unter L-Citrullin. Während unter Citrullin eine Teilnormalisierung des diastolischen Drucks verzeichnet werden kann, erhöht dieser sich unter Arginin (DiasD (in % der Ausgangswerte): IR: $429,44 \pm 122,12$; L-Arg: $587,04 \pm 70,26$ *; Cpost: $179,5\% \pm 110,2$ **/#; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; * signifikant gegen IR; # signifikant gegen L-Arg). Dem gegenüber steht der systolische Druck, der unter L-Citrullin unbeeinflusst bleibt, während er durch L-Arg deutlich ansteigt (SysD (in % der Ausgangswerte): IR: $63,67 \pm 16,63$; L-Arg: $98,19 \pm 17,59$ **; Cpost: $62,50 \pm 9,54$ ##; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; * signifikant gegen IR; # signifikant gegen L-Arg; n = 7 - 8).

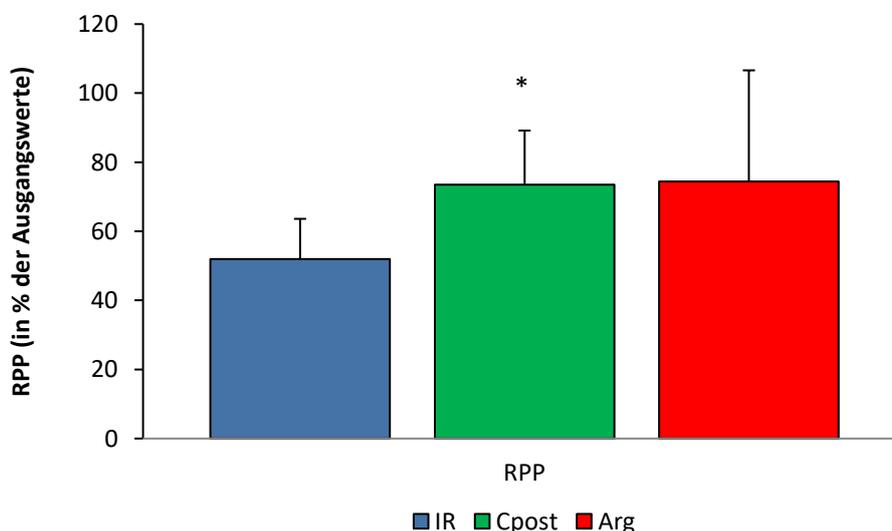


Fig. 18: RPP für IR, Cpost und Arg nach 3h Reperfusion. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm \delta$. * $P < 0,05$; n = 6 - 8.

3.2.6. Effekte auf das Herzödem

Da im Setting der IR mit einer endothelialen Dysfunktion zu rechnen ist, wurden die Einflüsse der einzelnen Versuchsprotokolle auf das Herzödem bestimmt. Zur Abschätzung des Ödems wurden die Quotienten aus Herzgewicht und Körpergewicht (HW/BW) miteinander verglichen. Konsistent mit dieser Annahme zeigt sich ein deutlicher Anstieg des Quotienten unter IR im Vergleich zu Nx. Dieser Anstieg kann durch L-Citrullin sowie L-NAME Citrullin-unabhängig gedämpft werden. Arginin hat keinen Einfluss auf das Herzödem (Fig. 19).

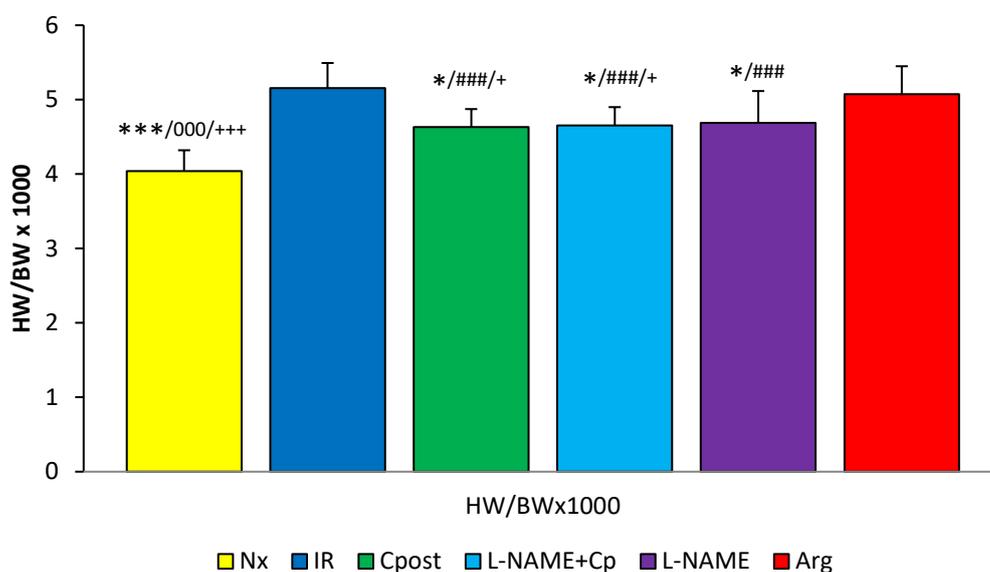


Fig. 19 : HW/BW x 1000 für Nx, IR, Cpost, L-NAME + Cp, L-NAME und Arg. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte \pm δ . * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; n = 6 - 8; * signifikant gegen IR; # signifikant gegen Nx; ° signifikant gegen L-NAME; + signifikant gegen Arg.

Da unter L-NAME eine Citrullin-unabhängige Reduktion des HW/BW Indexes vorliegt, legt dies die Vermutung nahe, dass dies nicht auf eine verminderte endotheliale Permeabilität zurückzuführen ist. Dieser Effekt könnte durch eine verstärkte Vasokonstriktion durch den unter L-NAME entstandenen NO-Mangel erklärt werden, der zu einem verminderten Perfusionsdruck der Kapillaren führen würde. Evidenz für diese Hypothese ergibt sich daraus, dass der koronare Widerstand unter L-NAME im Vergleich zu IR-Kontrolle deutlich erhöht ist, während er unter L-Citrullin unbeeinflusst bleibt (Fig. 20 und 21).

Ergebnisse

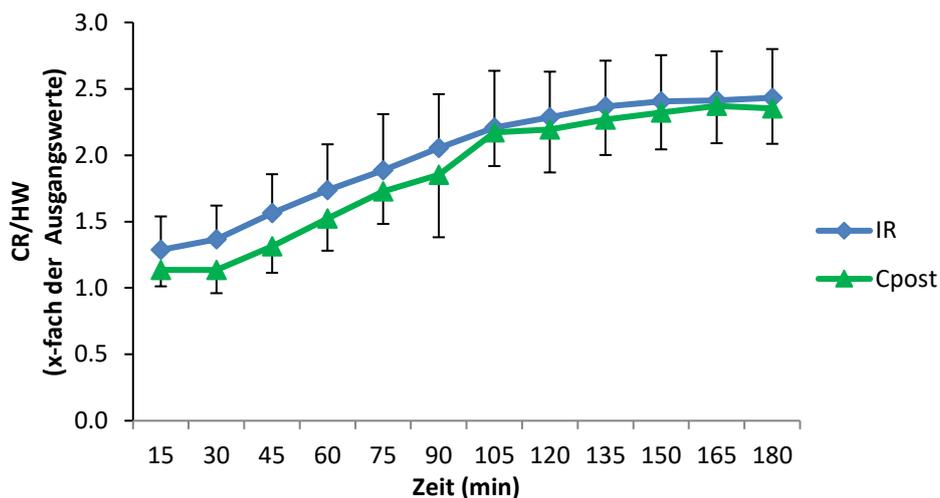


Fig. 20: Relative Erholung des auf das Herzgewicht (HW) normierten koronaren Widerstands (CR) für IR und Cpost. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm \delta$. n = 7 - 8

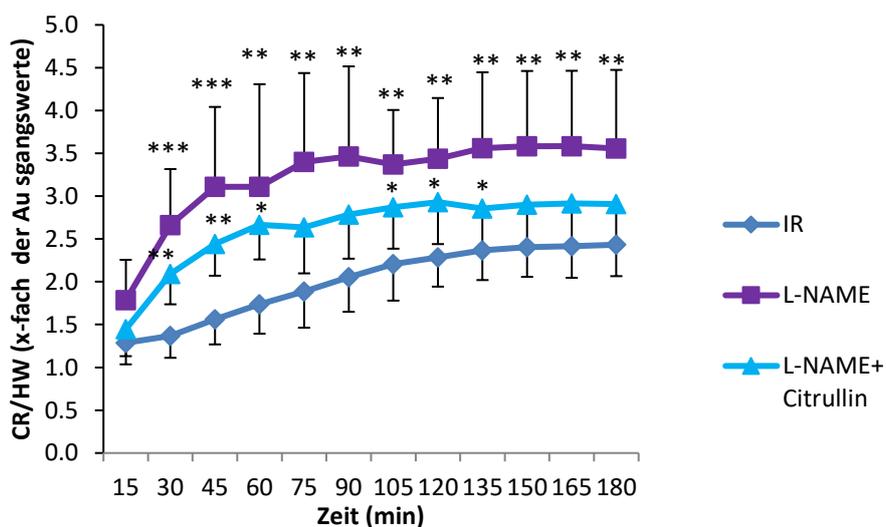


Fig. 21: Relative Erholung des auf das Herzgewicht normierten koronaren Widerstands für IR, L-NAME und L-NAME + Citrullin. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm \delta$. * P < 0,05; ** P < 0,01; n = 6 - 8; * signifikant gegen IR.

3.3. Linksventrikuläre Superoxidbildung

Um den Radikalstress zu quantifizieren, wurde eine DHE-Färbung an zwei Herzen pro Gruppe (IR, Cpost, L-NAME, L-NAME+ Cp) mit jeweils vier Schnitten pro Herz aus unterschiedlichen Ebenen durchgeführt.

Ergebnisse

Um die Auswertung zu objektivieren, wurde die Intensität der Helligkeit in Units/mm² mit der Software IMAGE J bestimmt.

Die so ermittelten Intensitäten wurden jeweils auf eine zeitgleich gefärbte IR-Kontrolle normiert, sodass das Endergebnis ein relatives Maß für das Fluoreszenzsignal darstellt.

Für den linken Ventrikel zeigt sich eine deutlich geringere Superoxidbildung unter L-Citrullin im Vergleich zur IR-Kontrolle, während es keine Unterschiede zwischen L-NAME und L-NAME + Cp gibt. Allerdings reduziert L-NAME die Bildung freier Sauerstoffradikale unabhängig von Citrullin (Fig. 22 und 23).

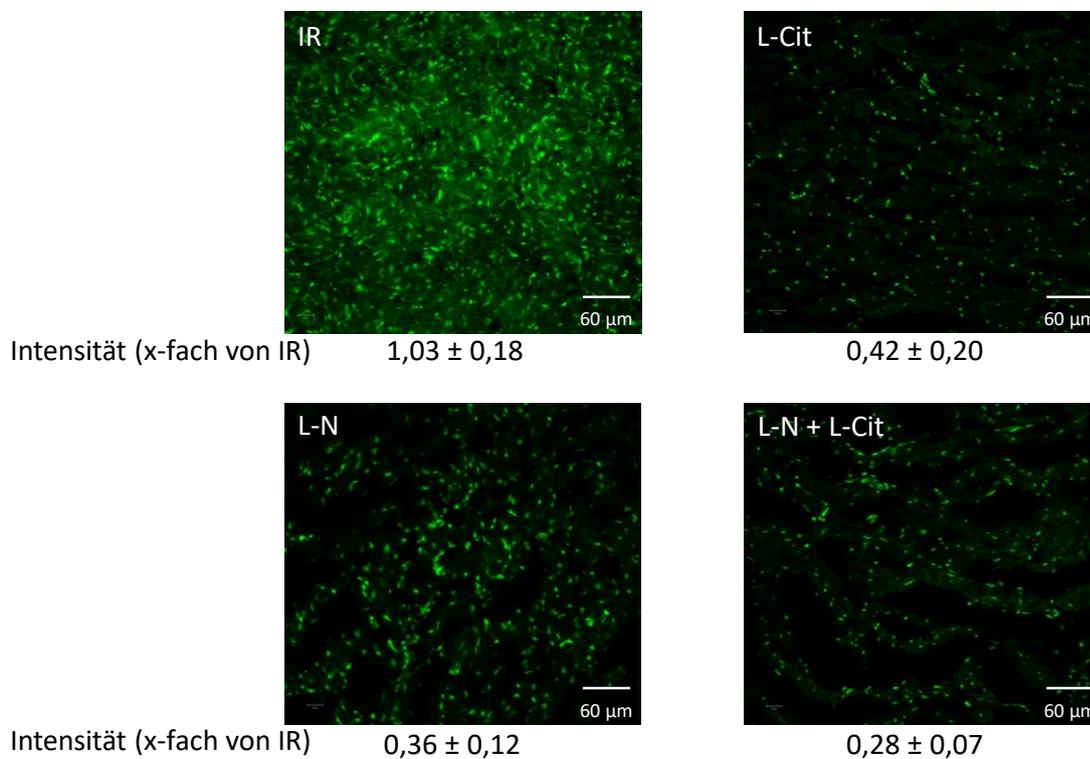


Fig. 22: Linksventrikuläre Superoxidbildung.

Die signifikant geringere Superoxidbildung unter Citrullin kann rechtsventrikulär bestätigt werden (nicht gezeigt).

Ergebnisse

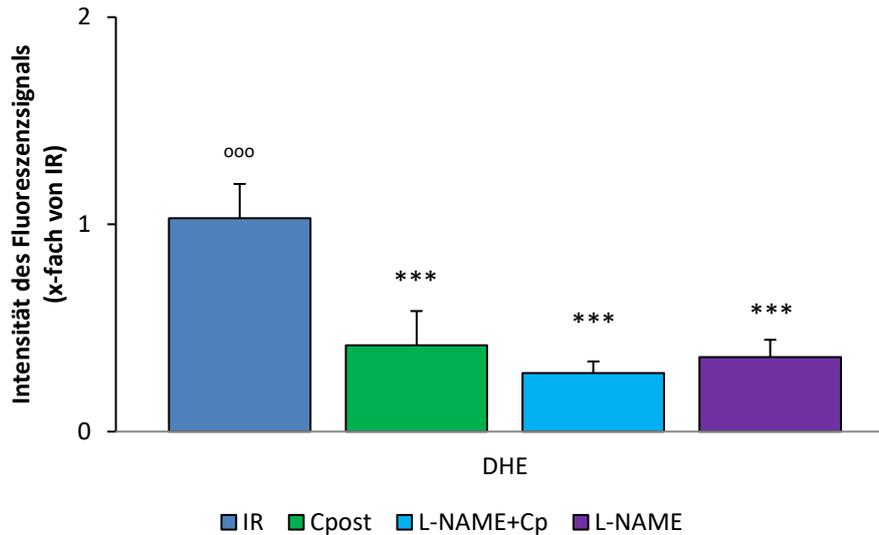


Fig. 23: Linksventrikuläre Superoxidbildung. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm \delta$.
*** $P < 0,001$; * signifikant gegen IR; ° signifikant gegen L-NAME.

3.4. Initiale Adaption der perfundierten Herzen auf RNA- und Proteinebene

Die initialen Effekte auf das Remodeling wurden mittels Expressionsanalyse auf RNA- und Proteinebene untersucht. Hierfür stellen qRT-PCR und Western blot etablierte Verfahren dar.

3.4.1. Arginase-NOS-System

Um eine Aussage über Veränderung der Expression der Gene des Arginase-NOS-Systems machen zu können, wurde eine qRT-PCR mit Primern für Arginase-1(Arg-1), Arginase 2 (Arg-2), endotheliale NO-Synthase (eNOS) und die Ornithindecaboxylase (ODC) durchgeführt. Citrullin steigert die Expression der Arg-1 NOS-abhängig, während Arg-2, ODC und eNOS in ihrer Expression durch Citrullin nicht beeinflusst werden. L-NAME führt zu einer Induktion der Arg-2 und der eNOS (Fig. 24). Die Citrullin bedingte gesteigerte Expression der Arg-1, kann auf Proteinebene mittels Western blot bestätigt werden (Fig. 25).

Ergebnisse

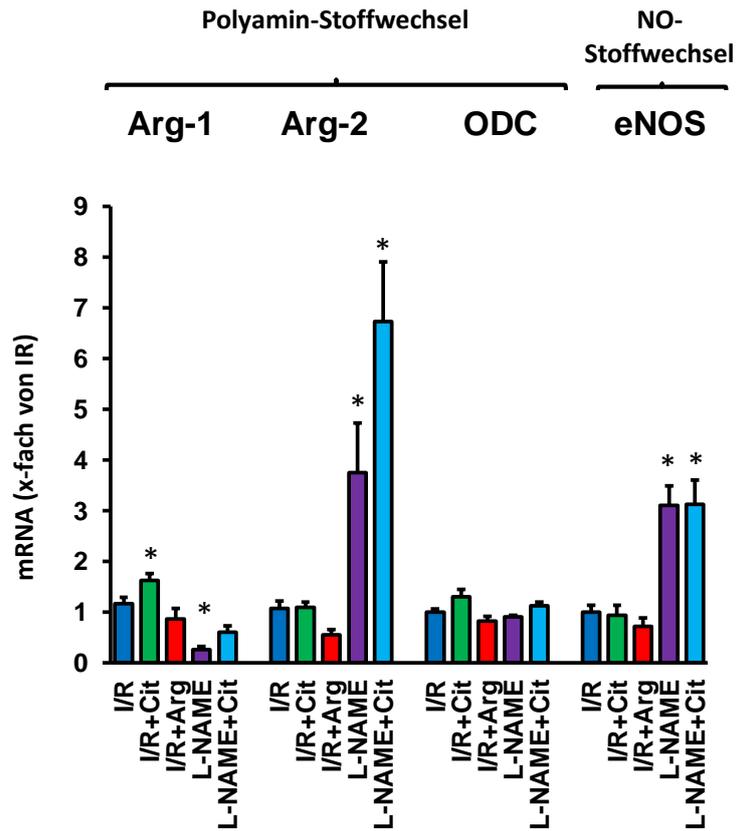


Fig. 24: Linksventrikuläre Expression von Arg-1, Arg-2, ODC und eNOS. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm \delta$. * $P < 0,05$; $n = 6 - 8$; * signifikant gegen IR.

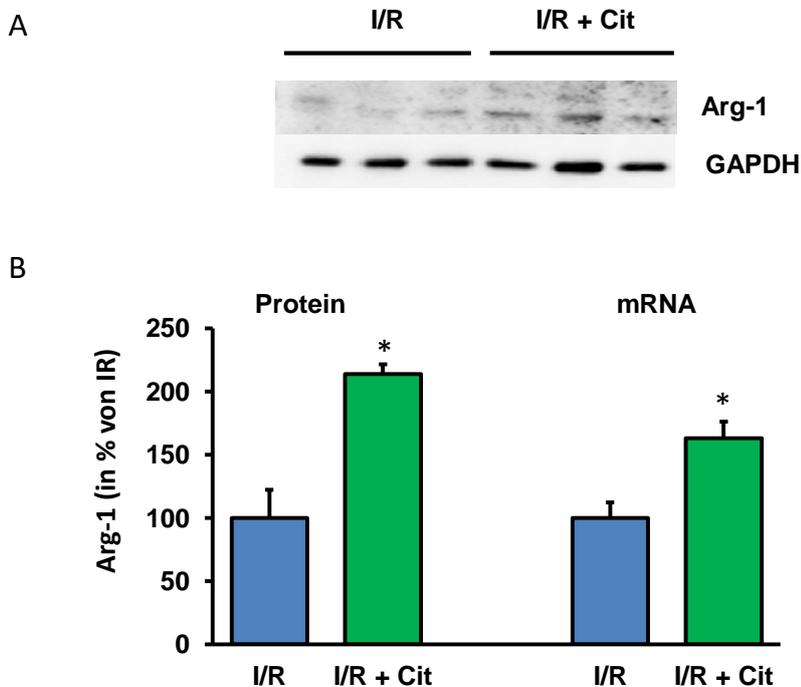


Fig. 25: Arginase-1 Expression. Western blot für Arg-1 und GAPDH (A), die relative Genexpression und die relative Proteinmenge von Arg-1 für den linken Ventrikel (IR, Cpost) (B). Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm \delta$. * $P < 0,05$; $n = 3$; * signifikant gegen IR.

3.4.2. Hypertrophie und Herzinsuffizienz

Als direktes Maß für die prohypertrophe Antwort des Myokards wurde die Expression von atrialem natriuretischen peptid (ANP) und brain natriuretic peptid (BNP) ermittelt. Für BNP zeigt sich durch Einfluss von L-Citrullin eine Normalisierung der Genexpression vergleichbar mit normoxen Bedingungen. Dieser Effekt kann auf NO zurückgeführt werden, da er durch L-NAME sogar ins Gegenteil verkehrt wird (Fig. 26). Für ANP zeigt sich ein ähnlicher Trend, allerdings sind die Unterschiede aufgrund der höheren Variabilität der Einzelwerte nicht signifikant (nicht gezeigt). Die NO-abhängige Citrullin-bedingte Normalisierung der postischämischen BNP-Expression kann auch für den rechten Ventrikel nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

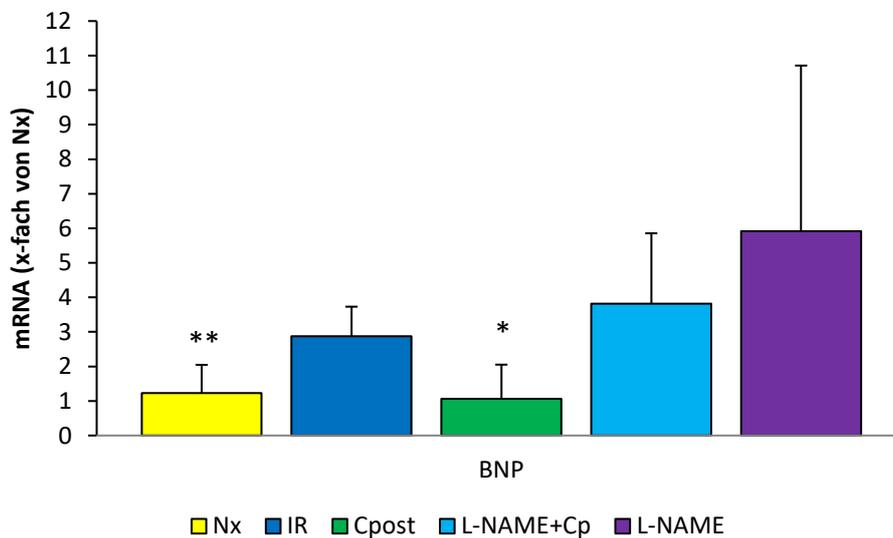


Fig. 26: Relative Genexpression BNPs für den linken Ventrikel. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm \delta$. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; $n = 6 - 8$; * signifikant gegen IR; # signifikant gegen Nx; ° signifikant gegen L-NAME.

Arginin hingegen ist nicht dazu in der Lage, die BNP-Expression zu normalisieren. Die relative Genexpression ist knapp sechsmal so hoch wie unter normoxen Bedingungen (Fig. 27).

Ergebnisse

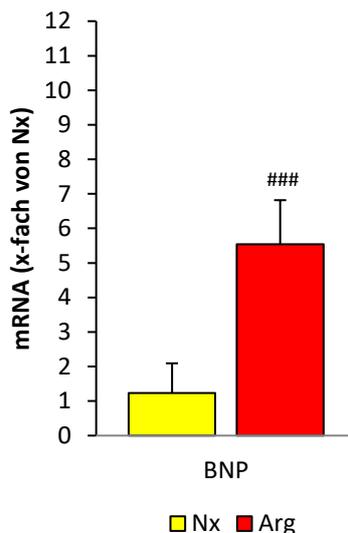


Fig. 27: Relative Genexpression BNPs für den linken Ventrikel. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm \delta$. *** $P < 0,001$; $n = 6 - 8$; # signifikant gegen Nx.

Aus der Familie der Calcitonin Gene Related Peptides (CGRP) wurde Intermedin/Adrenomedullin2 (IMD/ADM2) analysiert. Durch die IR gab es eine massive Repression IMDs, die durch postischämische Gabe von L-Citrullin teilnormalisiert werden kann. Dieser Effekt kann mit L-NAME nahezu komplett aufgehoben werden (Fig. 28). Dieses Ergebnis kann auf Ebene des rechten Ventrikels bestätigt werden (nicht gezeigt). Auf Proteinebene lassen sich aber noch keine Effekte nachweisen (nicht gezeigt).

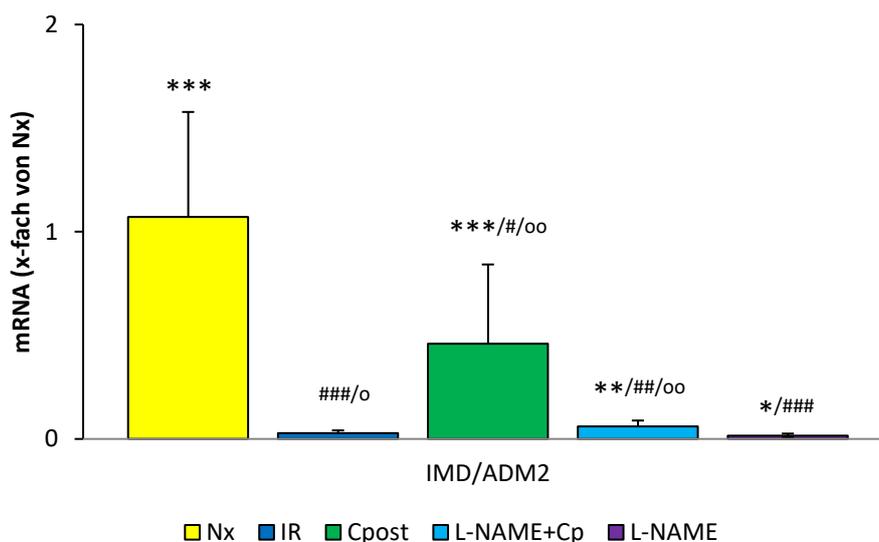


Fig. 28: Relative Genexpression von IMD/ADM2 für den linken Ventrikel. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm \delta$. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; $n = 6 - 8$; * signifikant gegen IR; # signifikant gegen Nx; ^o signifikant gegen L-NAME.

Ergebnisse

Für Arginin ist keine Teilnormalisierung der IMD-Expression nachweisbar. Die postischämische Repression ist vergleichbar mit der nach IR (Fig. 29).

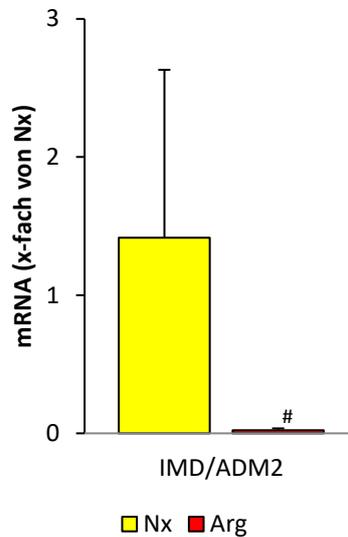


Fig. 29: Relative Genexpression von IMD/ADM2 für den linken Ventrikel. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm \delta$. * $P < 0,05$; $n = 6 - 8$; # signifikant gegen Nx.

3.4.3. Fibrose

Als direkter Fibrosemarker wurde Kollagen I (COI) verwendet. Die Genexpression von COI wird durch Citrullin signifikant reprimiert (Fig. 30). Dieser Effekt kann durch L-NAME komplett aufgehoben werden. Auch dieses Ergebnis lässt sich auf Ebene des rechten Ventrikels bestätigen (nicht gezeigt).

Für Arginin wird ein gegenteiliger Effekt beobachtet. Die COI-Expression wird gegenüber der Nx deutlich induziert (Fig. 31).

Ergebnisse

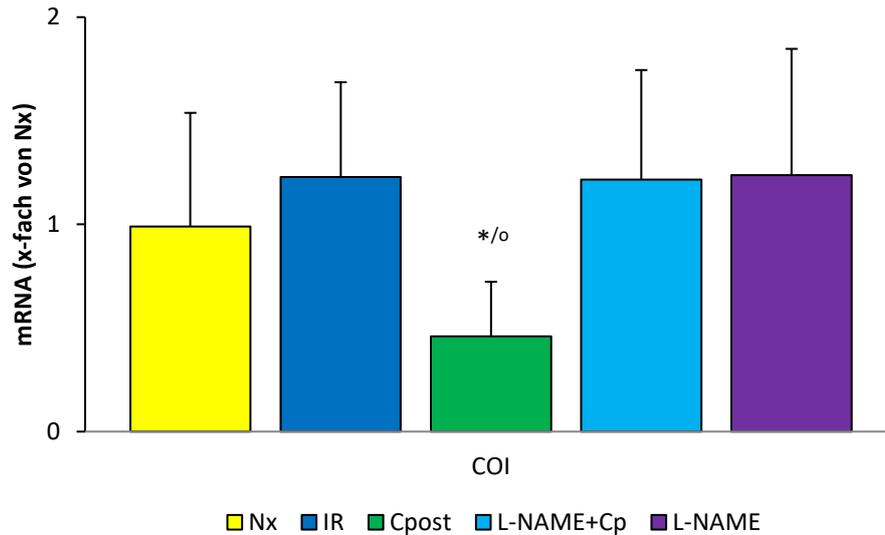


Fig. 30: Relative Genexpression von COI für den linken Ventrikel. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm \delta$. * $P < 0,05$; $n = 6 - 8$; * signifikant gegen IR; $^{\circ}$ signifikant gegen L-NAME.

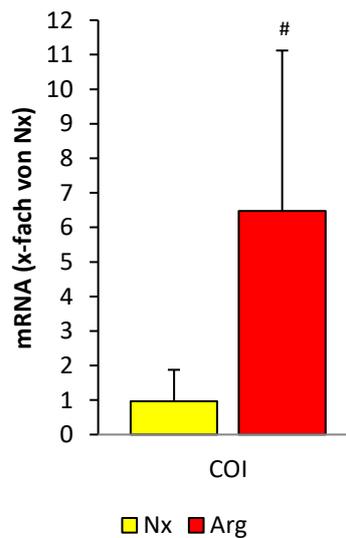


Fig. 31: Relative Genexpression von COI für den linken Ventrikel. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm \delta$. * $P < 0,05$; $n = 6 - 8$; # signifikant gegen Nx.

3.4.4. SERCA

Es wurde zusätzlich eine qRT-PCR für SERCA 2a durchgeführt. Sie wird durch IR induziert und unter Einfluss von Cpost in ihrer Expression normalisiert oder sogar leicht reprimiert. Dieser Effekt kann durch L-NAME teilweise aufgehoben werden. Allerdings scheint L-Citrullin die Expression SERCAs unabhängig von L-NAME zu reprimieren, da es einen

Ergebnisse

signifikanten Unterschied zwischen L-NAME und L-NAME + Cp gibt (Fig. 32). Dieser Effekt kann für den rechten Ventrikel und auf Proteinebene bestätigt werden (nicht gezeigt).

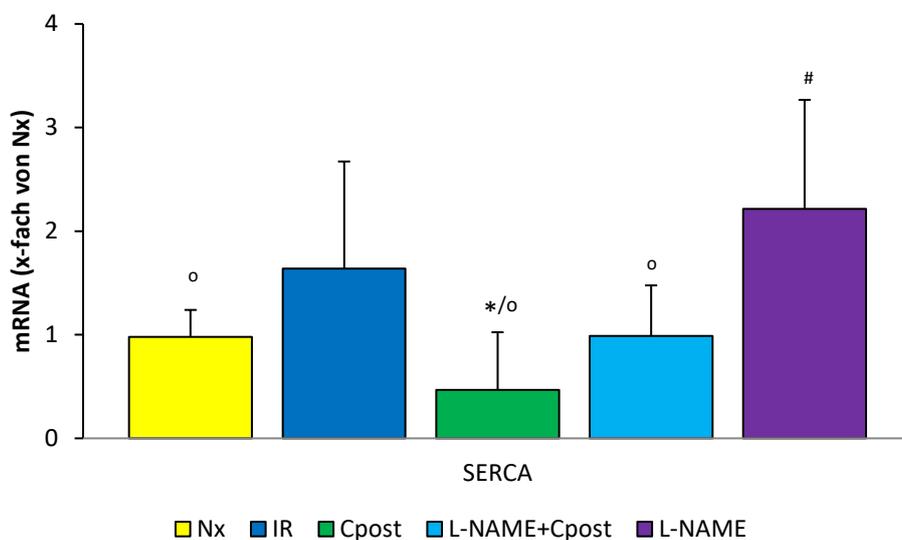


Fig. 32: Relative Genexpression SERCA2as für den linken Ventrikel Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm \delta$. * $P < 0,05$; $n = 6 - 8$; * signifikant gegen IR; # signifikant gegen Nx; ^o signifikant gegen L-NAME

Im Gegensatz zu Citrullin zeigt Arginin eine deutliche Induktion der SERCA-Expression. Auch wenn der Effekt aufgrund von einer hohen Variabilität der Einzelwerte nicht signifikant ist ($P = 0,055$), kann man durchaus von einer gegenteiligen Regulation sprechen (Fig. 33).

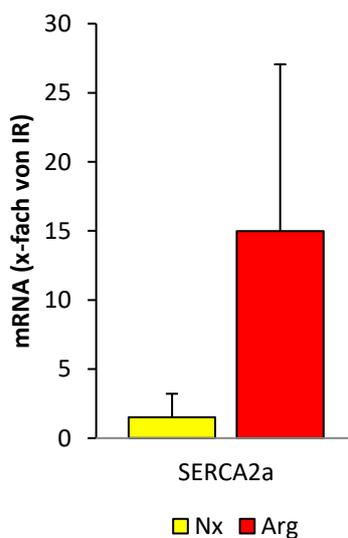


Fig. 33 zeigt die relative Genexpression von SERCA2a für den linken Ventrikel. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm \delta$. $n = 6 - 8$; # signifikant gegen Nx.

3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Citrullin ist dazu in der Lage, isolierte Kardiomyozyten positiv inotrop zu beeinflussen. Dieser Effekt kann durch NOS-Inhibition aufgehoben werden und ist auf das gesamte Herz übertragbar. Auch nach ischämischem Stress zeigt Citrullin einen funktionellen Benefit, der durch L-NAME aufgehoben werden kann. Zudem steigert Citrullin die Nitritkonzentration in den Perfusaten. Eine verbesserte postischämische Herzfunktion kann auch durch Arginin erreicht werden, allerdings unterscheiden sich die Profile der beiden Substanzen. Unter Citrullin kann eine Teilnormalisierung des diastolischen Drucks verzeichnet werden, während Arginin seinen funktionellen Benefit über eine Steigerung des systolischen Drucks erreicht.

Auch bezüglich der linkskardialen Superoxid-Bildung zeigt Citrullin eine Reduktion gegenüber der IR-Kontrolle. Diese Reduktion ist auch unter L-NAME nachweisbar. Es gibt aber keine Unterschiede zwischen L-NAME und L-NAME+Cp.

Für die initiale Adaption der Herzen auf RNA-Ebene sind im Wesentlichen zwei Dinge festzuhalten:

1. Die Citrullin-vermittelten Änderungen sind in der Regel NOS-abhängig
2. Citrullin und Arginin-vermittelte Effekte unterscheiden sich deutlich

Während Citrullin funktionell den NO-Stoffwechsel stimuliert, findet sich auf RNA-Ebene eine kompensatorische Induktion der Arginase-1. Bezüglich Hypertrophie und Fibrose zeigt Citrullin einen antihypertrophen (Teilnormalisierung der BNP und IMD-Expression) und antifibrotischen (Repression der COI-Expression) Effekt. Arginin hingegen deutet eine prohypertrophe (BNP-Induktion) und profibrotische (COI-Induktion) Wirkung an. Auch die SERCA-Expression wird durch beide Substanzen divergent beeinflusst. Citrullin reprimiert oder normalisiert ihre Expression, während sie durch Arginin induziert wird.

Die SERCA-Repression und Arginase-1-Induktion unter Citrullin können auf Proteinebene bestätigt werden.

4. Diskussion

4.1. Positiv inotrope Effekte L-Citrullins auf isolierte Kardiomyozyten und das gesamte Herz

Sowohl isolierte Kardiomyozyten als auch perfundierte Herzen können in einem nicht stimulierten Modell durch L-Citrullin positiv inotrop beeinflusst werden. Dieser Effekt kann an isolierten Herzmuskelzellen durch unspezifische NOS-Inhibition aufgehoben werden.

Dies legt nahe, dass der zugrundeliegende Mechanismus auf eine gesteigerte NO-Produktion der NOS-Isoformen zurückzuführen ist. Sowohl für nNOS als auch für eNOS sind positiv inotrope Wirkungen beschrieben (siehe Übersichtsartikel von Massion et al. 2005). So kann die im sarkoplasmatischen Retikulum lokalisierte nNOS die colokalisierte SERCA aktivieren (Khan et al. 2003), was in Kombination mit einer eNOS-abhängigen Aktivierung des Ryr2-Rezeptors zu einem effektiven Ca^{2+} -Cycling führen kann (Prendergast et al. 1997). Diese Effekte würden die beobachteten Wirkungen erklären. Allerdings sind auch negativ inotrope Effekte NOs bekannt. So können hohe Konzentrationen NOs den L-Typ Ca^{2+} -Kanal inhibieren, die ACh-Freisetzung aus parasymphatischen Nervenendigungen fördern und die Katecholaminausschüttung hemmen (siehe Übersichtsartikel von Massion et al. 2005). Auch das katecholaminerge downstream-signaling kann durch eNOS inhibiert werden (Massion et al. 2004). Diese bekannten Resultate scheinen den Beobachtungen dieser Arbeit zu widersprechen, sind aber mit ihr in Einklang zu bringen. Die negativ inotropen Effekte der eNOS sind weitestgehend Katecholamin- oder Acetylcholin-abhängig (siehe Übersichtsartikel von Massion et al. 2005). Sowohl cholinerge als auch adrenerge Stimulation fehlen in beiden Modellen, die in dieser Arbeit zur Analyse der funktionellen Auswirkung Citrullins verwendet wurden, sodass diese Effekte nicht zum Tragen kommen. Auch die NO-abhängige Inhibition von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen wird wahrscheinlich nicht durch Citrullin bewirkt, da es lediglich zu einem moderaten Anstieg der NO-Konzentration führen sollte.

Zudem ist bekannt, dass Citrullin nicht-kompetitiv die Arginase inhibieren kann (Shearer et al. 1997; Greenberg 1960). Dies bewirkt eine verminderte Ornithinsynthese und dadurch verminderte Polyaminkonzentrationen. Die verminderten Polyaminkonzentrationen können über eine geringere Aktivierung des CaSRs negativ inotrop wirken (Djukova et al. 2014). Da die Arginase unter physiologischen Bedingungen kaum aktiv ist, zeigt ihre Inhibition keine funktionellen Auswirkungen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Citrullin über einen moderaten Anstieg der myozytären NO-Konzentration eine positiv inotrope Antwort bewirkt (Fig. 34).

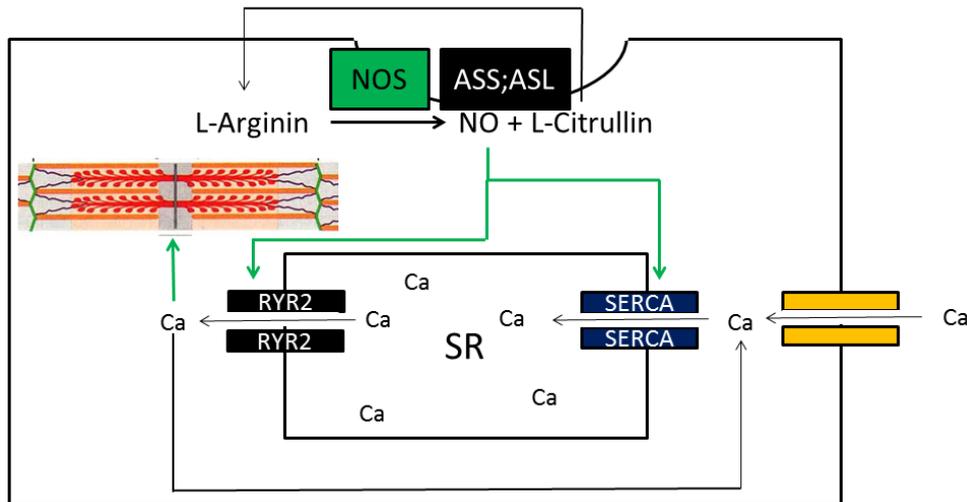


Fig. 34: Positiv inotrope Effekte L-Citrullins. L-Citrullin wird durch ASS und ASL zu L-Arginin. Diese Reaktionen speisen die NOS mit Substrat und sorgen für einen moderaten Anstieg der NO-Konzentration, welches über Aktivierung von SERCA und RyR2 zu einem effizienten Ca^{2+} -Cycling führt.

4.2. Funktioneller Benefit durch L-Citrullin bei postischämischer Reperfusion (IR)

Im Modell der Langendorff-Perfusion zeigte sich nur eine Verbesserung der postischämischen Herzfunktion, wenn L-Citrullin nach dem Infarkt appliziert wird (erhöhtes RPP, erhöhter LVDP, geringerer DiasD). Die Effekte der Citrullingabe können durch L-NAME inhibiert werden.

4.2.1. Kardiale Protektion nur bei postischämischer Applikation

Da sowohl bei präischämischer als auch bei postischämischer L-Citrullinapplikation eine Normalisierung des kardialen NO-Stoffwechsels zu erwarten ist, erstaunt es, dass nur letzteres einen funktionellen Benefit verursacht. Eine mögliche Erklärung liegt darin, dass L-Citrullin ein nicht-kompetitiver Arginase-Inhibitor ist (Shearer et al. 1997; Greenberg 1960). Die so entstehende verminderte Arginaseaktivität in der Ischämie könnte eine verminderte Protektion bedeuten (siehe Übersichtsartikel von Schlüter et al. 2015), die nicht durch erhöhte postischämische NO-Verfügbarkeit korrigiert werden kann. Evidenz für diese Hypothese ergibt sich daraus, dass Nor-NOHA bei präischämischer Applikation im Langendorff-Modell

die kardiale Kontraktilität nicht steigert (nicht publizierte Beobachtung unserer Arbeitsgruppe). Die Protektion durch Arginase könnte auf einer verminderten NO-Synthese während der Ischämie beruhen, für die bekannt ist, dass sie die kardiale Funktion beeinträchtigt (Depre et al. 1996). Auch die vermehrte Bildung von Polyaminen simuliert anabole Bedingungen und ist somit vielleicht in der Lage, den hypoxischen Zelltod durch Apoptose und Nekrose zu verzögern, auch wenn exzessive Aktivierung dieses Signalwegs die Apoptose aktiviert (Djukova et al. 2014; Giordano et al. 2010; Mörlein et al. 2010). Alles in allem sind diese Ergebnisse konsistent mit der Literatur, in der die Arginaseinduktion als wirkungsvolle Adaption gegen hypoxischen Zellschaden gesehen wird (siehe Übersichtsartikel von Schlüter et al. 2015).

4.2.2. Das Arginase/NOS-System in der Reperfusion

4.2.2.1. NO-Mangel und erhöhter oxidativer Stress limitieren den Reperfusionserfolg

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, steht aufgrund der hypoxischen Arginaseinduktion durch eRNA und TNF α der eNOS wenig L-Arginin zur Verfügung (Cabrera Fuentes et al. 2014; Schreckenberget al. 2015; Zhu et al. 2009). Allerdings ist sie durch das mit Ca²⁺-überladene Zytosol Kalmodulin-abhängig aktiviert (siehe Übersichtsartikel von Wu und Morris 1998). In diesem Fall bildet sie aufgrund des Arginindefizits anstelle von NO Superoxid (siehe Übersichtsartikel von Romero et al. 2006). Dieses Sauerstoffradikal kann direkt die kardiale Funktion beeinträchtigen, indem es Tropomyosine durch Oxidation von Cystein-Resten (Bildung von Disulfidbrücken) quervernetzt (Canton et al. 2006).

Zusätzlich entsteht eine verminderte NO-Verfügbarkeit. Dies verstärkt auf der einen Seite die Tropomyosinquervernetzung, da ROS nicht abgefangen werden kann (Grygelwski et al. 1986). Auf der anderen Seite fehlen seine eigenen protektiven Effekte. So kann NO z.B. durch eine PKG-abhängige Ca²⁺-Desensitivierung des Troponins die Hyperkontraktion dämpfen (siehe Übersichtsartikel von Massion et al. 2005) und eventuell im Ca²⁺-überladenen Zytosol für eine bessere Relaxation sorgen und die Infarktgröße begrenzen.

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die Arginase den NO-Stoffwechsel in der Reperfusion gleich doppelt negativ beeinflusst. Zum einen fehlen protektive Effekte NOs, zum anderen mindert Superoxid die kardiale Kontraktilität.

4.2.2.2. Funktionelle Konsequenzen der erhöhten Polyaminspiegel

Wie bereits in der Einleitung beschrieben können die Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin eine wirkungsvolle Adaption des Myokards bewirken, da sie Hypertrophie und eine Steigerung der Inotropie ermöglichen (siehe Übersichtsartikel von Schlüter et al. 2015).

In der Reperfusion können diese Fähigkeiten allerdings Nachteile mit sich bringen. Auf der einen Seite fördern sie im bereits mit Ca^{2+} -überladenen Zytosol zusätzlich die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR, was die Hyperkontraktion noch verstärken würde (Djukova et al. 2014). Auf der anderen Seite können sie Ursache von Arrhythmien sein (Schreckenberget al. 2014). In der Summe begünstigen Polyamine in der Reperfusion also eine Maladaptation.

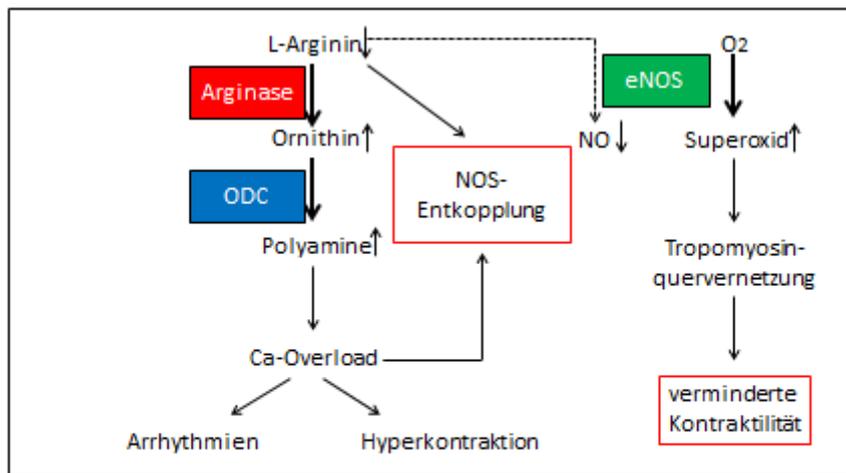


Fig. 35: Pathophysiologie der Arginase in der Reperfusion. Die hohe Arginaseaktivität bedingt die vermehrte Bildung von Polyaminen. Diese fördern die Überladung des Zytosols mit Ca^{2+} , was Arrhythmien, Hyperkontraktion und gemeinsam mit der geringen Argininverfügbarkeit eine eNOS-Entkopplung verursacht. Geringe NO-Verfügbarkeit und Bildung von maladapтивem Superoxid sind die Folge.

4.2.3. Normalisierung des Arginase-NOS-Systems durch L-Citrullin

Bei postischämischer Applikation Citrullins stellt sich eine verbesserte Herzfunktion, die vor allem auf eine bessere Relaxation zurückzuführen ist, dar. Diese Effekte sind wahrscheinlich auf eine NOS-Kopplung zurückzuführen, da der funktionelle Benefit durch L-NAME aufgehoben werden kann und sich unter Citrullin postischämisch ein geringerer linksventrikulärer Superoxidgehalt als nach reiner IR nachweisen lässt. Zusätzlich lässt sich das stabile Endprodukt des NO-Stoffwechsels, Nitrit, unter Citrullin vermehrt im Perfusat nachweisen.

Der Mechanismus, der zur Kopplung führt, stellt sich wahrscheinlich wie folgt dar: L-Citrullin kann auf zwei Wegen die Argininverfügbarkeit für die NOS steigern. Auf der einen Seite hemmt es nicht-kompetitiv die Arginase (Shearer et al. 1997; Greenberg 1960), auf der anderen Seite reagiert es in Caveolae durch die mit eNOS colokalisierten Enzyme ASS und ASL zu L-Arginin (Romero et al. 2006). In der Folge bildet die NOS NO statt Superoxid, was die protektiven Effekte erklären kann.

Mögliche Mechanismen einer NO-vermittelten Protektion wurden in der Einleitung bereits beschrieben und sollen hier diskutiert werden. Auf der einen Seite ist NO in einem PKG-abhängigen Mechanismus dazu in der Lage, Troponin für Ca^{2+} zu desensitivieren und so vor Hyperkontraktion zu schützen (Massion et al. 2005). Diese protektiven Effekte werden dadurch unterstützt, dass L-Typ Ca^{2+} -Kanäle durch von nNOS gebildetem NO gehemmt werden, was vor weiterer Ca^{2+} -Überladung und kreisenden Erregungen schützen kann (Ashley et al. 2002). Neben diesen direkten Effekten auf die kardiale Kontraktilität schützen e- und nNOS auch vor Überstimulation mit Katecholaminen, quasi wie ein endogener Beta-Blocker. Die in sympathischen und parasympathischen Nervenendigungen lokalisierte nNOS inhibiert die Freisetzung von Katecholaminen, während die Sekretion von Acetylcholin gesteigert wird (Herring und Paterson 2001; siehe Übersichtsartikel von Massion et al. 2005). Das freigesetzte Acetylcholin bindet an den muskarinschen Acetylcholinrezeptor 2 (M2R) und aktiviert darüber die eNOS (Balingand et al. 1993; Feron et al. 1997). Diese Isoform verstärkt die nNOS vermittelten antiadrenergen Effekte durch Inhibition cAMP und PKA-abhängiger Signaltransduktionen (Gauthier et al. 1998).

Da all diese Effekte eine negative Inotropie verursachen, gibt es NOS-abhängige Kompensationsmechanismen, die vor einem zu starken Verlust der Kontraktilität schützen. Hierzu gehört die nNOS vermittelte verstärkte Aufnahme von Ca^{2+} in das SR durch SERCA (Khan et al. 2003), sowie die dehnungsabhängige Aktivierung der eNOS und der damit verbundenen gesteigerten Ca^{2+} -Freisetzung durch den Ryanodinrezeptor 2 (RyR2) (Prendergast et al. 1997). Das hieraus resultierende effektivere Ca^{2+} -Cycling zwischen SR und Zytosol verhindert einen Einbruch der kardialen Kontraktilität. Zusätzlich ist NO dazu in der Lage als Radikalfänger zu wirken und so die destruktive Wirkung des Superoxids zu begrenzen (Grygelwski et al. 1986). Dies führt zu verminderter Tropomyosinquervernetzung und dadurch zu einer besseren Kontraktilität (Canton et al. 2006). Interessanterweise scheint die NOS-Inhibition in der Reperfusion keine negativen Auswirkungen zu haben. Dies stellt zunächst einen Widerspruch zu den eben beschriebenen Mechanismen dar, kann aber

durchaus nachvollzogen werden. In der Reperfusion bedingt die hohe Arginaseaktivität eine NOS-Entkopplung, sodass sie kaum NO bildet (Schreckenberget al. 2015). In diesem Fall könnte L-NAME primär den entkoppelten Zustand hemmen und so die Bildung von ROS begrenzen. Dies kann den eigentlich destruktiven Effekt der geringeren NO-Verfügbarkeit maskieren. Evidenz hierfür ergibt sich aus der geringeren Superoxidkonzentration der mit L-NAME perfundierten Herzen im Vergleich zur IR-Kontrolle, für die die Inhibition der in der Reperfusion entkoppelten eNOS die wahrscheinlichste Erklärung liefert.

Zusätzlich war Citrullin dazu in der Lage das postischämische Ödem zu begrenzen. Dies ist wahrscheinlich auf eine Teilnormalisierung der endothelialen Barrierefunktion zurückzuführen. Evidenz hierfür ergibt sich auf der einen Seite aus den eigenen Daten, da der koronare Widerstand unter L-Citrullin unbeeinflusst bleibt. Des Weiteren wurde bereits beschrieben, dass Citrullin eine geringere Diapedese von Neutrophilen in das Gewebe perfundierter Herzen sowie eine geringere ICAM-Expression verursacht (Ikeda et al. 2000). Dies bedeutet, dass der protektive Effekt Citrullins *in vivo* sogar größer sein könnte als hier dargestellt, da neben kardialen Protektionsmechanismen auch die Gewebedestruktion durch infiltrierende Leukozyten gedämpft werden könnte. Allerdings gibt es hierfür noch keine Evidenz.

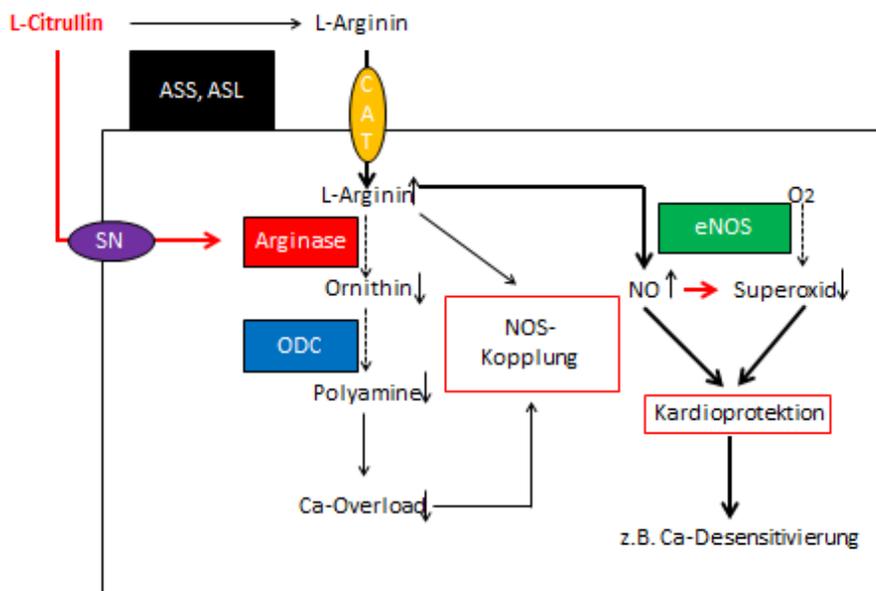


Fig. 36: Normalisierung des Arginase-NOS-Systems durch L-Citrullin. Einerseits wird Citrullin wahrscheinlich durch das Transportsystem für neutrale Aminosäuren (SN) in die Zellen transportiert. Dort hemmt es die Arginase, was gleichbedeutend mit geringeren Polyaminkonzentrationen und erhöhter Argininverfügbarkeit für eNOS ist. Andererseits wird die Argininverfügbarkeit durch die Umwandlung L-Citrullins zu L-Arginin noch verstärkt. Dies und die geringeren zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen bedingen eNOS-Kopplung, was zu Kardioprotektion durch geringere Bildung von Superoxid und erhöhte NO-Verfügbarkeit führt.

Die Frage nach der funktionellen Relevanz möglicherweise geringerer Polyaminspiegel kann nicht exakt beantwortet werden. Zwar gibt es keine relevanten Unterschiede in den analysierten Herzfunktionen zwischen L-NAME und L-NAME + Cp, jedoch könnte ein Teil der negativen Auswirkung der Polyamine auf der Ca-Kalmodulin-abhängigen Entkopplung der eNOS beruhen (Chen et al. 2008), die durch L-NAME genauso maskiert wird wie die protektiven Effekte NOs. Allerdings könnte die Arginaseinhibition langfristig protektive Effekte aufweisen, indem sie das kardiale Remodeling in eine protektive Richtung lenkt.

4.2.4. Einfluss von L-Arginin auf dieses System

Auch für Arginin kann ein funktioneller Benefit in der Reperfusion beobachtet werden. Dieser wird durch eine Steigerung des systolischen Drucks bewirkt, während der diastolische Druck im Vergleich zur IR-Kontrolle noch weiter ansteigt.

So sind bereits auf Ebene der Herzfunktion Unterschiede zwischen Citrullin und Arginin zu erkennen. Da die Citrullin vermittelten Effekte durch NOS-Inhibition aufgehoben werden können und ein anderes Profil als die Arginins zeigen, sollte ein anderer Wirkmechanismus zu Grunde liegen.

Die bekannte hohe Arginaseaktivität in der Reperfusion könnte hierfür eine Erklärung liefern (Schreckenberget al. 2015). Trotz direkter Argininapplikation wird der NOS so wahrscheinlich kaum mehr Arginin zur Verfügung gestellt. Somit verbleibt sie voraussichtlich weitestgehend im entkoppelten Zustand und bildet Superoxid. Diese Hypothese allein erklärt aber nicht die verbesserte Herzfunktion unter Arginin. Es muss darüber hinaus postuliert werden, dass das erhöhte Argininangebot vornehmlich durch die Arginase genutzt wird. So würden die Konzentrationen an Polyaminen noch weiter steigen.

Die so synthetisierten Polyamine könnten dann über die Bindung an den CaSR die intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen steigern (Djukova et al. 2014), was eine postischämische Erhöhung von systolischem und diastolischem Druck erklären kann.

In Kürze lässt sich sagen, dass Citrullin in der Reperfusion den Argininstoffwechsel zur NO-Synthese anregt, während Arginin wahrscheinlich über die Arginase die Polyaminsynthese fördert.

4.3. Effekte auf das initiale Remodeling

Die Effekte auf das initiale Remodeling wurden auf RNA- und Proteinebene untersucht.

4.3.1. Arginase-NOS-System

Auf RNA- und Proteinebene lässt sich für Citrullin eine Arginase-1-Induktion nachweisen. Dieser Effekt kann durch eine kompensatorische Induktion der Arginase erklärt werden. L-Citrullin inhibiert die Arginase und bewirkt so eine Akkumulation von Arginin (Shearer et al. 1997; Greenberg 1960). Hohe Argininkonzentrationen induzieren die Arginase (Morris et al. 1999). Die Induktion der Arginase bedeutet aber auch, dass ein plötzliches Absetzen Citrullins zu einem Reboundeffekt führt. Ein massiver NO-Mangel, Superoxid- und exzessive Polyaminbildung wären die Folge (siehe Abschnitt 4.2). Die Konsequenzen, die sich hieraus ableiten lassen, sind, dass Citrullin entweder ausgeschlichen oder als Dauertherapie weitergegeben werden muss, um die negativen Effekte der Arginase in der Reperfusion zu verhindern. Andere Gene des Arginase-NOS-Systems (Arg-2, ODC eNOS, iNOS) bleiben unbeeinflusst.

4.3.2. Hypertrophie und Fibrose

Im linken Ventrikel kann auf RNA-Ebene ein antihypertropher und antifibrotischer Effekt nachgewiesen werden (geringere BNP und COI-Expression, erhöhte IMD-Expression). Diese Effekte werden überwiegend NOS-abhängig vermittelt. Arginin selbst bewirkt das Gegenteil (BNP- und COI-Induktion, keine IMD-Normalisierung). Dies ist konsistent mit der Literatur, in der Polyaminen, einem Endprodukt des Arginase-Stoffwechsels, eine prohypertrophe und NO eine antihypertrophe und antifibrotische Wirkung zugeschrieben wird (Djukova et al. 2014; Jansens et al. 2004; Levy et al. 1990; Ozaki et al. 2002). Auch ein Cross-talk dieser beiden Systeme wurde bereits beschrieben und kann anhand der eigenen Daten nachvollzogen werden (Giordano et al., 2010). So ist NO dazu in der Lage die ODC zu inhibieren (Bauer et al., 2001) und so die Menge maladaptiver Polyamine zu begrenzen (Blachier et al., 1996), während Polyamine NOS-Inhibitoren sind (Hu et al., 1994).

Trägt man all dies zusammen, stellt man fest, dass die Effekte auf das Remodeling sich selbst verstärkende Mechanismen sind. In der Ischämie wird die Arginase induziert, was bis in die Reperfusion anhält (Cabrera-Fuentes et al. 2014, Schreckenber et al. 2015).

Die so entstandene hohe Arginaseaktivität speist die ODC mit ihrem Substrat und könnte so für eine vermehrte Bildung von Polyaminen sorgen. Diese kationischen Verbindungen verursachen nun einerseits direkt eine Hypertrophie (Djukova et al. 2014, Levy et al. 1990), auf der anderen Seite inhibieren sie die NOS und verhindern die antihypertrophen Wirkungen NOs (Hu et al. 1994).

Wird nun durch L-Citrullin die Arginase inhibiert und die NOS mit mehr Substrat versorgt, werden die maladaptiven Arginase-vermittelten Effekte gedämpft, indem die gebildete Menge an Polyaminen begrenzt wird. So entfällt die Polyamin-bedingte NOS-Inhibition und es entsteht ein erhöhtes Argininangebot. Die resultierende erhöhte NO-Verfügbarkeit wirkt einerseits direkt antihypertroph und begrenzt andererseits die Polyaminsynthese durch ODC-Inhibition (Fig. 37).

Arginin hingegen zeigt eine prohypertrophe und profibrotische Genexpression. Dies liegt möglicherweise an der hohen Arginaseaktivität in der Reperfusion. So steht der NOS trotz direkter Argininapplikation wohl kaum mehr Substrat zur Verfügung, sodass nicht mehr NO gebildet werden kann. Im Gegenteil, die sowieso schon aktive Arginase wird mit Substrat gespeist, sodass Polyamin- und Prolinsynthese noch weiter gefördert werden, was zu Hypertrophie und Fibrose führen würde. Diese Hypothese wird durch die eigenen Expressionsdaten sowie die Literatur untermauert. So ist bekannt, dass Arginin nicht dazu in der Lage ist, dem ventrikulären Remodeling bei spontan hypertensiven Ratten vorzubeugen (Brooks et al. 2009).

Alles in allem bleibt festzuhalten, dass durch L-Citrullin im Gegensatz zu Arginin, NOS-abhängig und unabhängig, das initiale kardiale postischämische Remodeling auf RNA-Ebene in eine protektive Richtung weg von Hypertrophie und Fibrose gelenkt werden kann. Ob dies in einem *in vivo* Modell tatsächlich langfristig der Entwicklung einer Herzinsuffizienz vorbeugen kann, muss allerdings noch verifiziert werden, da der hier beobachtete Zeitabschnitt dafür zu kurz ist.

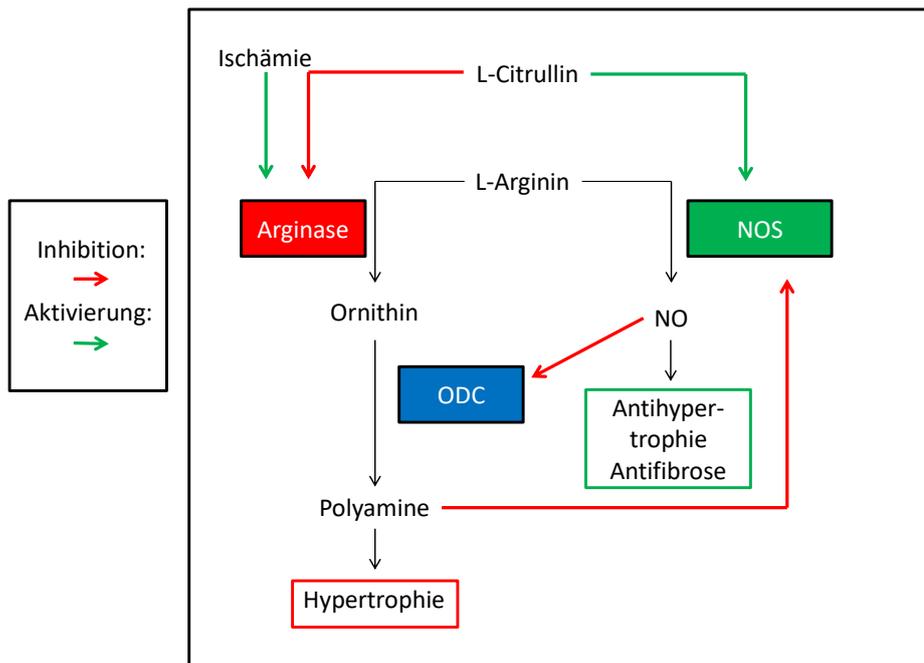


Fig. 37: Effekte des Arginase-NOS-Systems auf das Remodeling und die Wirkung L-Citrullins. In der kardialen Ischämie wird die Arginase induziert. Dies hat zur Folge, dass die NOS ihr Substrat verliert und kein NO bildet. Stattdessen entstehen Ornithin und Polyamine. Letztere führen zu einer Hypertrophie und inhibieren die NOS. Dieser Pathomechanismus kann durch L-Citrullin unterbrochen werden. Es speist die NOS durch Umwandlung in Arginin und Arginaseinhibition mit Substrat, sodass NO entsteht. Dieses Gas hat antihypertrophe und antifibrotische Wirkung. Außerdem verhindert es die Polyaminsynthese durch eine Hemmung der ODC.

4.3.3. SERCA

Problematisch stellt sich der Einfluss von Citrullin auf die Expression des Ca^{2+} -Transporters SERCA2a dar. Es kann unter Citrullin eine NOS-unabhängige Repression SERCAs im Vergleich zu IR auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. Für den LV stellt sich dieses Bild auch auf Proteinebene ein. Die SERCA-Expression ist unter Citrullin mit der unter normoxen Bedingungen zu vergleichen, sodass man von einer Normalisierung sprechen könnte. Dennoch ist diese Induktion im Allgemeinen als protektiver Mechanismus akzeptiert, der die Entwicklung einer Herzinsuffizienz bremsen kann (siehe Übersichtsartikel von Tham et al. 2015). Auf der anderen Seite ist im LV bereits nach drei Stunden eine geringere Proteinmenge unter Citrullin nachweisbar als nach reiner IR, die funktionell keine Relevanz hat, da die Citrullin-behandelten Herzen eine bessere Kontraktilität zeigen als die IR-Kontrolle. Dieses Ergebnis führt zu der Hypothese, dass L-Citrullin über eine den normoxen Bedingungen entsprechende NO-Verfügbarkeit oder eine reduzierte Polyaminkonzentration die SERCA-Expression funktionell normalisiert, sodass die vorhandene Menge SERCA

ausreicht um eine normale Kontraktilität aufrechtzuerhalten. Bei reiner IR dient diese Induktion wahrscheinlich als Kompensation der in der Reperfusion stark erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Spiegel.

Arginin bewirkt auch hier genau das Gegenteil. Es bewirkt eine starke SERCA-Induktion. Ob diese bereits auf Proteinebene vorliegt, bleibt jedoch unklar. Dennoch scheint dies ein protektiver Effekt Arginins zu sein, der vielleicht auf die hohen Polyaminkonzentrationen und den damit verbundenen zytosolisch erhöhten Ca^{2+} -Spiegel zurückzuführen ist. Diese in der Regel als protektiv angesehene Adaption birgt auch Risiken. So kann sie zu einer Überladung des sarkoplasmatischen Retikulums mit Ca^{2+} führen, was über spontane Ca^{2+} -Freisetzung Arrhythmien bedingen könnte (siehe Übersichtsartikel von Fröhlich et al. 2013). Ein klinisches Beispiel hierfür liefert Digoxin. Auch hier wird über die Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration das sarkoplasmatische Retikulum mit Kalzium überladen. Lebensgefährliche ventrikuläre Tachykardien können die Folge sein (Aktories et al. 2013). Nicht zuletzt ist dies der Grund dafür, warum es in der aktuellen Herzinsuffizienztherapie kaum noch Anwendung findet (DGK 2013).

Alles in allem stellt sich eine ungünstige Beeinflussung des Ca^{2+} -Haushalts durch Citrullin dar. Zwar hat die SERCA-Repression durch Citrullin im linken Ventrikel keine funktionellen Auswirkungen (bessere Relaxation der behandelten Herzen), ist aber vor einer möglichen klinischen Anwendung zu bedenken. Somit sollte diese Therapieoption zunächst an einem *in vivo* Infarktmodell über einen Zeitraum von mehreren Tagen getestet werden, bevor eine klinische Studie erfolgt.

4.4. Mögliche klinische Anwendung und Ausblick

In dieser Arbeit kann anhand der kardialen IR als Modell der Arginaseinduktion *in vitro* gut belegt werden, dass Citrullin die negativen Effekte dieser Stressreaktion (erhöhter Radikalstress, geringere NO-Verfügbarkeit u.a.) effektiv dämpfen kann. Diese Ergebnisse führen zu der Überlegung, ob dies auch auf andere Fälle des Arginindefizits übertragbar ist.

Mögliche klinische Anwendungen ergeben sich dort, wo ein durch Argininmangel induziertes NO-Defizit pathophysiologisch relevant ist. Einige Beispiele sollen hier im Folgenden diskutiert werden:

4.4.1. Myokardinfarkt

Das dem in dieser Arbeit behandelten Modell ähnlichste Beispiel ist sicherlich der Myokardinfarkt. Für ihn konnte am Menschen bereits gezeigt werden, dass im infarzierten Bereich eine erhöhte Arginaseaktivität vorliegt (Smirnov et al. 1974). Diese Arginaseaktivierung funktioniert wahrscheinlich analog zur der am Tiermodell beobachteten Induktion. So kann die Arginase durch TNF- α , das lokale RAS und Superoxid aktiviert werden (Cabreera Fuentes et al. 2014; Schreckenberget al. 2015; siehe Übersichtsartikel von Schlüter et al., 2015). Einmal aktiviert, bedingt sie einen Argininmangel für die NOS, der in ihrer Entkopplung und weiterer Superoxidbildung resultiert, sodass die Arginase ihre eigene Aktivierung positiv rückkoppelt (siehe Übersichtsartikel von Schlüter et al. 2015). Dieser Circulus vitiosus kann am Langendorffmodell durch Citrullin wirkungsvoll durchbrochen werden und ist vielleicht in die klinische Praxis übertragbar.

Dafür spricht, dass viele Probleme, die sich im klinischen Alltag bei der Therapie des Myokardinfarkts ergeben, in dem hier verwendeten Modell gedämpft werden können.

Zunächst ist dabei an Citrullin bedingten funktionellen Benefit in der Reperfusion zu denken. Dies könnte eventuell in kritischen Fällen vor akutem Pumpversagen schützen und so in der Akutphase der Therapie einigen Patienten das Leben retten. Nichtsdestotrotz sollten diese Effekte Citrullins erst mit einem *in vivo* Infarktmodell bestätigt werden, bevor versucht wird, das Gefundene in die Klinik zu transferieren. Um dem Versuchsaufbau dieser Arbeit möglichst nahe zu kommen, müsste Citrullin im Moment der Reperfusion intravenös appliziert werden.

Ein weiteres klinisches Problem des Myokardinfarkts sind die postischämischen hypertrophen und fibrotischen Umbauprozesse, die zu einer weiteren Abnahme der Herzfunktion führen (Goel et al., 2013; Bordie et al., 2006; Tham et al., 2015; Widimsky et al., 2010; Vedanthan et al., 2014; siehe Übersichtsartikel von Heusch et al., 2014). Diese Arbeit liefert Indizien dafür, dass Citrullin NOS-abhängig das postischämische Remodeling auf RNA-Ebene antihypertroph und antifibrotisch beeinflussen kann. Dies könnte eine ausreichende Herzfunktion nach dem Infarkt langfristig sichern, bleibt aber zunächst rein spekulativ. Im Rahmen eines *in vivo* Infarktmodells mit langfristiger Gabe von L-Citrullin als Postinfarkttherapie könnte die Hypothese verifiziert werden, um den Schritt zu einer klinischen Studie zu wagen.

4.4.2. Hirninfarkt

Ein weiteres Modell von Ischämie und Reperfusion in der Klinik liefert der ischämische Hirninfarkt. Auch wenn die exakte Rolle der Arginase hier nicht bekannt ist, gibt es doch Daten, die eine erhöhte Arginaseaktivität nach zerebraler Ischämie zeigen (Clarkson et al. 2004). Auch die Tatsache, dass diese ein durch Argininmangel bedingtes zerebrales NO-Defizit bedingen kann, ist durchaus belegt (Aladag et al. 2009). Nimmt man diese beiden Dinge zusammen, legt dies nahe, dass die Arginase durch verminderte NO-Verfügbarkeit für eine postischämische endotheliale Dysfunktion sorgen kann, wie es bereits für andere Gewebe beschrieben wurde (Ross 1999, Bonetti et al. 2003). Diese erhöhte postischämische endotheliale Permeabilität könnte die Entstehung eines Reperfusionsoedems begünstigen. Ein Ansatz, diese Ödembildung zu minimieren wäre der Einsatz von Arginaseinhibitoren wie Nor-NOHA. Allerdings könnte der doppelte Wirkmechanismus Citrullins (natürlicher Argininonor und Arginaseinhibitor (siehe Einleitung)) vielleicht von Vorteil sein. Auch diese Hypothese entbehrt zur Zeit jeder experimentellen Evidenz und muss noch verifiziert werden.

4.4.3. Herzinsuffizienztherapie

Die Herzinsuffizienz stellt eine der häufigsten internistischen Erkrankungen in Europa dar (McMurray et al. 2000). In 90% der Fälle wird sie durch die koronare Herzerkrankung (KHK) und arterielle Hypertonie verursacht (Lip et al. 2000). Myokardiale Schäden bedingen die Aktivierung von Adaptionsprozessen, die physiologischerweise die Funktion haben, das Herzzeitvolumen zu steigern. Ihre chronische Aktivierung führt zum kardialen Remodeling (Hypertrophie und Fibrose), was zu einer progredienten Funktionseinschränkung des Ventrikels führt (Weil et al. 2006). Fasst man dies zusammen, stellt man fest, dass die Arginase sowohl an den Ursachen als auch an den kardialen Adaptionsprozessen pathophysiologisch beteiligt ist, sodass ihre Inhibition eine interessante neue Option in der Herzinsuffizienztherapie darstellt (Djukova et al. 2014, Maxwell et al. 2002).

Das durch die Arginaseaktivierung entstehende NO-Defizit kann sowohl das Remodeling als auch die Herzfunktion direkt negativ beeinflussen (Post et al. 2006). In diesem Fall kann Citrullin als natürlicher NO-Donor die NOS wieder mit Substrat speisen und so die negativen Effekte überwinden. Auch die Fähigkeiten als direkter Arginaseinhibitor wären von Vorteil, indem das Polyamin- und Prolin-abhängige Remodeling gedämpft würde (siehe 4.3.).

Auch β -adrenerge Effekte könnten durch eine wieder aktive eNOS als endogenem β -Blocker wirkungsvoll begrenzt werden (siehe Übersichtsartikel von Massion et al. 2005). Allerdings bietet die Restaurierung der eNOS-Funktion einen Vorteil: Sie trägt durch die scherstressabhängige Stimulation des RyR₂ zu einem funktionierenden Frank-Starling-Mechanismus bei (Prendergast et al. 1997).

Auch für diese These gibt es noch keine Evidenz. Allerdings stehen mit *in vivo* Infarktmodellen, spontan hypertensiven Ratten, aortalem und pulmonal arteriellem banding viele *in vivo* Herzinsuffizienzmodelle zur Verfügung, die in Kombination mit Arbeiten an isolierten Herzen und Herzmuskelzellen dieser Fragestellung auf den Grund gehen könnten.

4.4.4. Atherosklerosetherapie

Auch die Atherosklerose ist initial durch eine endotheliale Dysfunktion, die durch geringe NO-Verfügbarkeit verursacht wird, gekennzeichnet (Ross et al., 1999; Bonetti et al., 2003). Daher wundert es auch nicht weiter, dass in ApoE^{-/-}-Mäusen eine erhöhte Arginaseaktivität in der Aorta gefunden wird (Ming et al. 2004; Royo et al. 2008). Auch das atherogene oxLDL bewirkt über die Bindung an den lectin-like oxLDL scavenger receptor-1 (LOX-1) über den RhoA/ROCK-Signalweg (Rho associated Protein Kinase) eine Arginaseaktivierung (Ryoo et al. 2006; Ryoo et al. 2011, Wang et al. 2011), die durch ROS in Endothelzellen noch gesteigert werden kann (Chandra et al. 2012). Trägt man diese Beispiele zusammen, stellt man fest, dass die Arginase eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielt. Dies wird noch untermauert, indem gezeigt werden konnte, dass Arginaseinhibition die NO-Produktion in humanen Endothelzellen nach oxLDL-Exposition normalisiert, die NO-Produktion in der Aorta von ApoE^{-/-}-Mäusen erhöht (Ryoo et al. 2008) und die endothelabhängige Dilatation von oxLDL gestressten Koronararterien bei Schweinen verbessert (Wang et al. 2011).

Aus diesen Daten geht hervor, dass Arginaseinhibition und somit auch Citrullin eine wirkungsvolle Therapie der Atherosklerose darstellen könnte, da es sowohl natürlicher Argininonor als auch Arginaseinhibitor ist (siehe Übersichtsartikel von Romero et al. 2006). Auch hier bleibt abzuwarten, ob der duale Wirkmechanismus Citrullins gegenüber reiner Arginaseinhibition von Vorteil ist. Hierfür steht eine Reihe an Atherosklerosemodellen zur Verfügung, die zur Beantwortung dieser Fragestellung dienen können. Allerdings bleibt einschränkend zu sagen, dass trotz vieler vielversprechender Kandidaten bisher noch kein Durchbruch in klinischen Studien erzielt werden konnte.

Des Weiteren sind tierexperimentelle Daten bekannt, die eine Plaquestabilisierung durch Arginaseinduktion beschreiben (Wang et al. 2014). Dieser Effekt sei im Wesentlichen auf ihre antiinflammatorische Wirkung und die Polyamin-bedingte Proliferation glatter Muskelzellen zurückzuführen (Wang et al. 2014). Nimmt man hierauf Bezug, so muss eingeräumt werden, dass Arginaseinhibition die Wahrscheinlichkeit kardiovaskulärer Events durch Plaqueruptur steigern könnte.

Alles in allem kann festgehalten werden, dass eine Vielzahl an Erkrankungen mit einer Arginaseaktivierung assoziiert ist. Dies fächert auch die möglichen Anwendungsgebiete Citrullins relativ breit. Die aus meiner Sicht vielversprechendsten Möglichkeiten (Myokardinfarkt, Hirninfarkt, Herzinsuffizienz und Atherosklerose) wurden hier kurz dargestellt. Ob sich Citrullin tatsächlich als der optimale Weg zur Beeinflussung des Arginase-NOS-Systems erweist, bleibt jedoch abzuwarten.

5. Zusammenfassung

Der Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz sind sehr häufige und oft zum Tode führende Erkrankungen, die trotz guter Kenntnis der Pathophysiologie noch nicht zufriedenstellend therapiert werden können. Im Wesentlichen besteht die Problematik darin, dass die postischämischen Umbauprozesse (Hypertrophie und Fibrose) nicht aufgehalten werden können und so beide Erkrankungen progredient verlaufen. In beiden Fällen gibt es steigende Evidenz dafür, dass durch Arginaseaktivierung ein Argininmangel erzeugt wird, der zu einer verminderten NO-Verfügbarkeit, erhöhten Superoxid-Konzentrationen und vermehrter Polyaminbildung führt. Diese drei Komponenten limitieren den Therapieerfolg. Eine mögliche Intervention stellt Citrullin dar, da es sowohl Arginaseinhibitor als auch natürlicher Arginindonor ist.

An normoxen im elektrischen Feld stimulierten Herzmuskelzellen von Ratten kann Citrullin die kardiale Kontraktilität NO-abhängig steigern. Als Infarkt- bzw. Herzinsuffizienzmodell wurden retrograd perfundierte Rattenherzen einer 45 min Globalischämie mit anschließender 3 stündiger Reperfusion unterzogen. Die postischämische Herzfunktion kann unter Citrullin durch eine bessere Relaxation NO-abhängig gesteigert werden. Auch Arginin führt zu einer gesteigerten postischämischen Herzfunktion, diese wird aber im Gegensatz zu Citrullin, durch eine gesteigerte Kontraktilität bei verringerter Relaxation verursacht. Anhand von Dihydroethidiumbromid-Färbungen konnte gezeigt werden, dass Citrullin den postischämischen oxidativen Stress reduziert. Neben den funktionellen Effekten auf den Argininstoffwechsel induziert Citrullin die postischämische Expression der Arginase-I, auf Protein- und RNA-Ebene. Darüber hinaus konnte nach 3h Reperfusion auf RNA-Ebene ein antihypertropher und antifibrotischer Effekt Citrullins nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigt Arginin ein prohypertrophes und profibrotisches Expressionsmuster.

Die erhobenen Daten legen nahe, dass die postischämische Applikation von Citrullin über Arginaseinhibition und Konversion zu Arginin eine Kopplung der NO-Synthese bewirkt. Eine erhöhte linksventrikuläre NO-Verfügbarkeit sowie geringere Superoxidbildung sind die Folge, und führen zu einer besseren Herzfunktion sowie einer antihypertrophen und antifibrotischen Antwort des Myokards auf RNA-Ebene. Im Gegensatz dazu stimuliert Arginin wahrscheinlich primär die Arginase getriebene Polyaminsynthese. Dies ist zwar initial mit einer gesteigerten Kontraktilität assoziiert, zeigt aber ein profibrotisches und prohypertrophes Expressionsmuster.

6. Summary

Myocardial infarction and heart failure are common diseases, which are highly lethal. Even the detailed knowledge of the underlying pathomechanisms does not guarantee satisfactory therapies. This is mainly caused by cardiac remodeling, hypertrophy and fibrosis, leading to impaired ventricular function. In both cases, arginase activation is considered to play a key role. Its activation causes a lack of arginine, which leads to NO-deficiency, excessive superoxide formation by uncoupled NO-synthase, and high concentrations of polyamines, a downstream product of arginase. All three components may limit the therapeutic success. A likely candidate to interfere with arginase activation is L-citrulline, a natural arginine precursor and non-competitive inhibitor of arginase.

Under normoxic conditions citrulline improved load free cell shortening of isolated cardiomyocytes via increased NO-formation. In order to simulate myocardial infarction and heart failure in-vitro, retrograde perfused hearts of rats underwent 45 min of global ischemia followed by 3 h of reperfusion. Citrulline increased left ventricular NO bioavailability, thereby leading to reduced left ventricular end diastolic pressure and improved cardiac function. Arginine does also enhance postischemic heart function, but primarily due to a more powerful contraction. To quantify left ventricular superoxide-formation dihydroethidiumbromide staining has been used. Radical stress was attenuated by citrulline. Besides the functional effects on arginine metabolism, citrulline induces Arginase-I expression on RNA- and protein-level. After 3 h of reperfusion citrulline was associated with an antihypertrophic and antifibrotic RNA pattern. In contrast arginine treatment resulted in a prohypertrophic and profibrotic effect on RNA-level.

Taken together, citrulline mediates cardioprotection through NOS-coupling and arginase inhibition, which has been pointed out on functional and RNA-level. Exactly the opposite is achieved by arginine treatment. Even if arginine improves postischemic heart function, it still mediates maladaptive processes, which might be explained by higher substrate offer to arginase, leading to excessive polyamine and proline formation. All in all, citrulline seems to be a highly promising candidate to interfere successfully with arginase-NOS-System. If this can be transferred into clinical practice of cardiovascular medicine remains unclear.

7. Literaturverzeichnis

- Abou-Mohamed G, Johnson JA, Jin L, et al. Roles of superoxide, peroxynitrite, and protein kinase C in the development of tolerance to nitroglycerin. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308:289–299.
- Agullo´ L, Garcı´a-Dorado D, Inerte J et al. L-Arginine limits myocardial cell death secondary to hypoxia-reoxygenation by a cGMP-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Cir. Physiol*; 1999; 276: H1574–H1580.
- AIRE_Investigators Effect of ramipril on mortality and morbidity of survivors of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure. The Acute Infarction Ramipril Efficacy (AIRE) Study Investigators. *Lancet* 1993; 342(8875):821–828.
- Aktories K, Förstermann U, Hofmann F B et al. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 11.Auflage *Elsevier* 2013: 414-418.
- Aladag MA, Turkoz Y, Parlakpınar H et al. Melatonin ameliorates cerebral vasospasm after experimental subarachnoidal haemorrhage correcting imbalance of nitric oxide levels in rats. *Neurochem Res* 2009; 34: 1935–1944.
- Anderson IA, Igumnova E, Kidal AB et al. Reassessment of a Suggested Pharmacological Approach to Heart Failure: L-Arginine is only a marginal NO donor in Pigs. *J Cardiovasc Pharmacol* 2012; 60: 262-268.
- Angermann CE and Ertl G. Natriuretic peptides — new diagnostic markers in heart disease. *Herz* 2004; 29(6): 609-617.
- Ashley EA, Sears CE, Bryant SM et al. 2002. Cardiac nitric oxide synthase 1 regulates basal and betaadrenergic contractility in murine ventricular myocytes. *Circulation* 2002; 105: 3011– 3016.
- Balligand JL, Kelly RA, Marsden PA, et al. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 347–351.
- Bauer PM, Buga GM, Fukuto JM et al. Nitric oxide inhibits ornithine decarboxylase via S-nitrosylation of cysteine 360 in the active site of the enzyme. *J Biol Chem* 2001; 276: 34458-64.
- Baum J, Duffy HS. Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011; 57: 376–379.
- Baxter GF. The natriuretic peptides. *Basic Res Cardiol* 2004; 99: 71-75.

- Bell D and McDermott BJ. Intermedin (adrenomedullin-2): a novel counter-regulatory peptide in the cardiovascular and renal systems. *British Journal of Pharmacology* 2008; 153: 247–262.
- Berkowitz DE, White R, Li D et al. Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. *Circulation* 2003; 108: 2000–2006.
- Bienvenu LA, Reichelt ME, Delbridge LM et al. Mineralocorticoid receptors and the heart, multiple cell types and multiple mechanisms: a focus on the cardiomyocyte. *Clin Sci* 2013; 125: 409–421.
- Bivalacqua TJ, Hellstrom WJ, Kadowitz PJ et al. Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum: In diabetic-associated erectile dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283: 923–927.
- Blachier F, Robert V, Selamnia M et al. Sodium nitroprusside inhibits proliferation and putrescine synthesis in human colon carcinoma cells. *FEBS Lett* 1996; 396: 315–8.
- Boelens PG, van Leeuwen PA, Dejong CH et al. Intestinal renal metabolism of L-citrulline and L-arginine following enteral or parenteral infusion of L-alanyl-L-[2,15N]glutamine or L-[2,15N]glutamine in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: 679–685.
- Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 168–175.
- Booz, G. W. Putting the breaks on cardiac Hypertrophy. *Hypertension* 2005; 45: 341–346.
- Brodie BR, Stone GW, Cox DA et al. Impact of treatment delays on outcomes of primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: Analysis from the CADILLAC trial. *Am Heart J* 2006; 151: 1231–1238.
- Cabrera-Fuentes HA, Ruiz-Meana M, Simseyikyilmaz S et al. RNase 1 prevents the damaging interplay between extracellular RNA and tumor necrosis factor- α in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Thromb Haemost* 2014; 112, 1110–1119.
- Chandra S, Romero M, Shatanawi A et al. Oxidative species increase arginase activity in endothelial cells through the RhoA/Rho kinase pathway. *Br J Pharmacol* 2012; 165: 506–519.
- Canton M, Skyschally A, Menabo R et al. Oxidative modification of tropomyosin and myocardial dysfunction following coronary microembolisation. *Eur Heart J* 2006; 27: 875–881.

- Chen B, Xuc J, Meng X et al. Resveratrol prevents hypoxia-induced arginase II expression and proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells via Akt-dependent signalling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014; 307: 317-325.
- Chen H, Wang X, Tong M et al. Intermedin Suppresses Pressure Overload Cardiac Hypertrophy through Activation of Autophagy. *PLoS ONE* 2013; 8: e64757. doi:10.1371/journal.pone.0064757.
- Chen K, Pittman RN, Popel AS. Nitric oxide in the vasculature: where does it come from and where does it go? A quantitative perspective. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10:1185–1198.
- Chen K, Popel AS. Nitric oxide production pathways in erythrocytes and plasma. *Biorheology* 2009; 46:107–119.
- CIBIS-II Investigators. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* 1999; 353(9146): 9–13.
- Clarkson AN, Liu H, Pearson L et al. Neuroprotective effects of spermine following hypoxic-ischemic-induced brain damage: a mechanistic study. *FASEB J* 2004; 18: 1114–1116.
- Cohen MV, Yang XM, Downey JM. Nitric oxide is a preconditioning mimetic and cardioprotectant and is the basis of many available infarct-sparing strategies. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 231–239.
- Cohen MV, Yang XM, Downey JM. The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. *Circulation*. 2007; 115: 1895–1903.
- The CONSENSUS Trial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med* 1987; 316(23):1429–1435.
- Cynober L, Le Boucher J, Vasson M. Arginine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1995; 6: 402–413.
- Daniels LB, Maisel AS. Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 2357-2368.
- Depre C., Fierain L., Hue L. Activation of nitric oxide synthase by ischemia in the perfused heart. *Cardiovascular Research* 1997; 33: 82-87.
- DGK. ESC Pocket Guidelines: Herzinsuffizienz: Leitlinien für die Diagnose und Behandlung der akuten und chronischen Herzinsuffizienz. DGK 2012.

- Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P und Russel J . Cardioprotection and pharmacological therapies in acute myocardial infarction: Challenges in the current era. *World J Cardiol* 2014; 6(3): 100–106.
- Dyukova E, Schreckenber R, Arens C et al. The Role of Calcium-Sensing Receptors in Endothelin-1-Dependent Effects on Adult Rat Ventricular Cardiomyocytes: Possible Contribution to Adaptive Myocardial Hypertrophy. *J Cell Physiol.* 2017; 232(9): 2508-2518.
- Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 38079– 38086.
- Feron O, Dessy C, Moniotte S, et al. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest.* 1999; 103: 897– 905.
- Fischmeister R, Castro L, Abi-Gerges A, et al. Species- and tissue-dependent effects on NO and cyclic GMP on cardiac ion channels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2005; 142: 136-143.
- Flogel U, Merx MW, Godecke A, et al. Myoglobin: a scavenger of bioactive NO. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001.; 98: 735–740.
- Frishman WH. Beta-adrenergic blockers. *Circulation* 2003; 107(18):e117–e119
- Fröhlich GM, Meier P, White SK et al. Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI. *Eur Heart J.* 2013; 34(23): 1714-22.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (Lond)* 1980; 288: 373-376.
- Fu X, Li S., Jia G et al. Protective effect of the nitric oxide pathway in L-Citrulline renal ischaemia-reperfusion injury in rats. *Fiola Biologica (Praha)* 2013; 59: 225-232.
- Gauthier C, Leblais V, Kobzik L et al. The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest* 1998; 102: 1377–1384.
- Giordano E, Flamighini F, Guarnieri C, et al. Polyamine in cardiac physiology and disease. *Open Heart Fail J* 2010; 3: 25-30.
- Giraldez RR, Panda A, Xia Y, et al. Decreased Nitric-oxide Synthase Activity Causes Impaired Endothelium dependent Relaxation in the postischemic Heart. *J Biol Chem,* 1997 ; 272 (34): 21420-21426.
- Goel K, Pinto DS, Gibson M. Association of time to reperfusion with left ventricular function and heart failure in patients with acute myocardial infarction treated with

primary percutaneous coronary intervention: A systematic review. *Am Heart J* 2013; 165: 451–467.

- Goodwin BL, Solomonson LP, Eichler DC. Argininosuccinate synthase expression is required to maintain nitric oxide production and cell viability in aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 18353–18360.
- Gonon AT, Jung C, Katz A et al. Local arginase inhibition during early reperfusion mediates cardioprotection via increased nitric oxides production. *PLoS ONE* 2012; 7(7): e42038.
- Gou L, Zhang L, Yin C et al. Protective effect of L-citrulline against acute gastric mucosal lesions induced by ischemia-reperfusion in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2011; 89: 317-327.
- Greenberg D. Arginase. *Methods in Enzymology* 1955; 2: 368-374.
- Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986; 320: 454–456.
- Hallemeesch MM, Janssen BJ, de Jonge WJ et al. NO production by cNOS and iNOS reflects blood pressure changes in LPS-challenged mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: 871–875.
- Hao G, Xie L, Gross SS. Argininosuccinate synthetase is reversibly inactivated by S-nitrosylation *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 2004; 279: 36192–36200.
- Hare JM. Spatial confinement of isoforms of cardiac nitric-oxide synthase: unravelling the complexities of nitric oxide's cardiobiology. *Lancet* 2004; 363, 1338– 1339.
- Hare JM, Stamler JS. NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J Clin Invest* 2005; 115: 509– 517.
- Harpster MH, Bandyopadhyay S, Thomas DP, et al. Earliest changes in left ventricular transcriptome post-myocardial infarction. *Mamm Genome* 2006; 17: 701-715.
- Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 1997; 100: 2153–2157.
- Hearse D, Humphrey SM, Chain EB. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol* 1973; 5: 395-407.

- Hein TW, Zhang C, Wang W et al. Ischemia-reperfusion selectively impairs nitric oxide mediated dilatation in coronary arteriols: counteractin role of arginase. *FASEB J* 2003; 17: 2328-2330.
- Herring N, Paterson DJ. Nitric oxide –cGMP pathway facilitates acetylcholine release and bradycardia during vagal nerve stimulation in the guinea-pig in vitro. *J Physiol* 2001; 535: 507– 518.
- Heusch G, Libby P, Gersh B et al. Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet* 2014; 383: 1933–1943.
- Heusch G. Molecular Basis of Cardioprotection: Signal Transduction in Ischemic Pre-, Post-, and Remote Conditioning. *Circ Res* 2015; 116: 674-699.
- Hu J, Mahmoud MI, el-Fakahany EE. Polyamines inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Neurosci Lett* 1994; 175: 41-45.
- Husson A, Brasse-Lagnel C, Fairand A et al. Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle. *Eur J Biochem* 2003; 270: 1887–1899.
- Ignarro LJ, Cirino G, Casini A et al. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 34: 879–886.
- Ikeda Y, Young LH, Scalia R et al. Cardioprotective of citrulline in ischemia/ reperfusion injury via a non-nitric oxide mediated mechanism. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2000; 22(7): 563-571.
- Inserte J, Barba I, Poncelas-Nozal M, Hernando V et al. cGMP/PKG pathway mediates myocardial postconditioning protection in rat hearts by delaying normalization of intracellular acidosis during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2011; 50: 903–909.
- Janssens S, Pokreisz P, Schoonjans L et al. Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 improves left ventricular performance and reduces compensatory hypertrophy after myocardial infarction. *Circ Res* 2004; 94: 1256–1262.
- Jenkinson CP, Grody WW, and Cederbaum SD. Comparative properties of arginases. *Comp Biochem Physiol* 1996; 114B: 107–132.
- Jin Y, Chen B, Tipple TE et al. Arginase II is a target of miR-17-5p and regulates miR17-5p expression in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014; 307: 197-204.
- Jean C, Rome S, Mathe V et al. Metabolic evidence for adaptation to a high protein diet in rats. *J Nutr* 2001; 131: 91–98.

- Johnson G III, I'sao PS, Mulloy D et al.. Cardioprotective effects of acidified sodium nitrite in myocardial ischemia with reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 252: 35-41.
- Johnson G III, Ysao PS, Lefer AM. Cardioprotective effects of authentic nitric oxide in myocardial ischemia with reperfusion. *Crit Care Med* 1991; 19: 244-252.
- Jung C, Gonon AT, Sjöquist P-O et al. Arginase inhibition mediates cardioprotection during ischemia-reperfusion. *Cardiovascular research* 2010; 85: 147-154.
- Jung F, Palmer LA, Zhou N et al. Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase via hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes. *Circ Res* 2000; 86: 319–325.
- Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F et al. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 6388-6393.
- Kaesemeyer WH, Ogonowski AA, Jin L et al. Endothelial nitric oxide synthase is a site of superoxide synthesis in endothelial cells treated with glyceryl trinitrate. *Br J Pharmacol* 2000; 131: 1019–1023.
- Khan SA, Skaf MW, Harrison RW et al. Nitric oxide regulation of myocardial contractility and calcium cycling: independent impact of neuronal and endothelial nitric oxide synthases. *Circ Res* 2003; 92: 1322– 1329.
- Kleinert H, Schwarz PM., Forstermann U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem* 2003; 384: 1343– 1364.
- Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71(4): 549–574.
- Kuhn KP, Harris PA, Cunningham GR et al. Oral citrulline effectively elevates plasma arginine levels for 24 h in normal volunteers. *Circulation AHA Scientific Sessions* 2006; abstract 1692: II-1339.
- Lefer Allan M. Attenuation of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury With Nitric Oxide Replacement Therapy. *Ann Thorac Surg* 1995; 60: 847-851.
- Levy D, Garrison RJ, Savage DD et al. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *NEJM* 1990; 322: 1561-1566.
- Li H, Menninger CJ, Hawker JR et al. Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline synthesis in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280: 75-82.

- Lim GB. Heart failure: LCZ696- a PARADIGM shift in treatment for heart failure. *Nat Rev Cardiol* 2014; 11: 618.
- Lip GY, Gibbs CR, and Beevers DG. ABC of heart failure: aetiology. *Bmj* 2000; 320 (7227): 104-107.
- Massion PB, Pelat M, Belge C et al. Regulation of the mammalian heart function by nitric oxide *Comp Biochem Physiol. A Mol Integr Physiol* 2005; 142: 144-150.
- Massion PB, Dessy C, Desjardins F et al. Cardiomyocyte-restricted overexpression of endothelial nitric oxide synthase (NOS3) attenuates β -adrenergic stimulation and reinforces vagal inhibition of cardiac contraction. *Circulation* 2004; 110: 2666–2672.
- Maxwell AJ and Cooke JP. Cardiovascular effects of L-arginine. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998; 7: 63–70.
- Maxwell AJ. Mechanisms of dysfunction of the nitric oxide pathway in vascular diseases. *Nitric Oxide* 2002; 6: 101–124.
- McDonald KK, Zharikov S, Block ER et al. A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the “arginine paradox.” *J Biol Chem* 1997; 272: 31213–31216.
- McErlean ES, DeLuca SA, van Lente F et al.. Comparison of troponin T versus creatine kinase-MB in suspected acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* 2000; 85: 421-426.
- McMurray JJ. Clinical practice. Systolic heart failure. *NEJM* 2010; 362(3): 228–238.
- Mc Murray JJ, Packer M, Desai AS et al. Angiotensin-neprilysin and renin-angiotensin inhibition versus enalapril in heart failure. *NEJM* 2014;371:993-1004.
- Mc Murray JJ and Stewart S. Epidemiology, aetiology and prognosis of heart failure. *Heart* 2000; 83(5): 569-602.
- MERIT-HR Study Group. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* 1999; 353(9169): 2001–2007.
- Ming XF, Barandier C, Viswambharan H et al. Thrombin stimulates human endothelial arginase enzymatic activity via RhoA/ROCK pathway: Implications for atherosclerotic endothelial dysfunction. *Circulation* 2004; 110: 3708–3714.
- Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *NEJM* 1993; 329: 2002–2012.

- Mörlein C, Schreckenberg R und Schlüter KD. Basal ornithine decarboxylase activity modifies apoptotic and hypertrophic marker expression in post-ischemic hearts. *Open Heart Fail J* 2010; 3: 31-37.
- Morris SM Jr. Arginine synthesis, metabolism, and transport: regulators of nitric oxide synthesis. *Cellular and Molecular Biology of Nitric Oxide*, edited by Laskin JD and Laskin DL. New York: Dekker, 1999; 57–85.
- Morris SM Jr. Arginine metabolism in vascular biology and disease. *Vasc Med* 2005 10: 83-87.
- Morris SM Jr. Regulation of enzymes of urea and arginine synthesis. *Annu Rev Nutr* 1992; 12: 81–101.
- Oldenburg O, Qin Q, Krieg T et al. Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 286: 468–476.
- Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase attenuates cardiac hypertrophy induced by chronic isoproterenol infusion. *Circ J* 2002; 66: 851-856.
- Packer M, Coats AJ, Fowler MB et al. Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *NEJM* 2001; 344(22):1651–1658.
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 5256.
- Packer M, McMurray JJ, Desai AS et al. Angiotensin receptor neprilysin inhibition compared with enalapril on the risk of clinical progression in surviving patients with heart failure. *Circulation* 2015; 131: 54-61.
- Penna C, Mancardi D, Rastaldo R et al. Intermittent activation of bradykinin B2 receptors and mitochondrial KATP channels trigger cardiac postconditioning through redox signaling. *Cardiovasc Res*. 2007; 75: 168–177.
- Perkins K-AA., Pershad S, Chen Q et al. The Effects of modulating eNOS activity and coupling in ischemia/reperfusion (I/R). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2012; 385: 27-38.
- Petroff MG, Kim SH, Pepe S et al. Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of Ca²⁺ release in cardiomyocytes. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 867–873.
- Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction.

Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *NEJM* 1992; 327(10): 669–677.

- Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB et al. Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. *Lancet* 2003; 362: 759-766.
- Piechota M, Banach M, Jacon A et al. Natriuretic peptides in cardiovascular diseases. *Cell Mol Biol Lett* 2008; 13(2): 155-181.
- Piper HM, Abdallah Y, Schäfer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 2004; 61: 365–371.
- Pitt B, Zannad F, Remme WJ et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *NEJM* 1999; 341(10): 709–717.
- Pollock JS Forstermann U, Mitchell JA et al. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88: 10480–10484.
- Post H, Pieske B. Arginase: a modulator of myocardial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: 1747–1748.
- Prendergast BD, Sagach VF, Shah AM. Basal release of nitric oxide augments the Frank–Starling response in the isolated heart. *Circulation* 1997; 96: 1320–1329.
- Romero MJ, Plat DH, Caldwell RB et al. Therapeutic use of citrulline in cardiovascular disease. *Cardiovasc Drug Rev* 2006; 24: 275-290.
- Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *NEJM* 1999; 340: 115–126.
- Ryoo S, Bhunia A, Chang F et al. OxLDL-dependent activation of arginase II is dependent on the LOX-1 receptor and downstream RhoA signaling. *Atherosclerosis* 2011; 214: 279–287.
- Ryoo S, Gupta G, Benjo A et al. Endothelial arginase II: a novel target for the treatment of atherosclerosis. *Circ Res* 2008; 102: 923–932.
- Ryoo S, Lemmon CA, Soucy KG et al. Oxidized low-density lipoprotein-dependent endothelial arginase II activation contributes to impaired nitric oxide signaling. *Circ Res* 2006; 99: 951–960.
- Sacks CA, Jarcho JA, Curfman GD. Paradigm shifts in heart-failure therapy – a timeline. *NEJM* 2014; 371: 989-991.

- Santos ES, Baltar VT, Pereira MP et al. Comparison between cardiac troponin I and CK-MB mass in acute coronary syndrome without st elevation. *Arquiv Brasil Cardiol* 2011; 96: 179-187.
- Schlüter K.-D., Schulz R., Schreckenber R. Arginase induction and activation during ischemia and reperfusion and functional consequences for the heart. *Front Physiol* 2015; 6: 65.
- Schmidt TS, Alp NJ. Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Clin Sci (Lond)* 2007; 113: 47–63.
- Schreckenber R, Weber P, Cabrera-Fuentes HA et al. Mechanism and consequences of the shift in cardiac arginine metabolism following ischemia and reperfusion in rats. *Thromb. Haemost* 2015; 113: 482-493.
- Schreckenber R, Djukova E, Stidikova G et al. Mechanisms by which calcium receptor stimulation modifies electromechanical coupling in isolated ventricular cardiomyocytes. *Pfluger Arch* 2014; 467(2): 379-388.
- Schulman SP, Becker LC, Kass DA et al. L-arginine therapy in acute myocardial infarction: The Vascular Interaction With Age in Myocardial Infarction (VINTAGE MI) randomized clinical trial. *JAMA* 2006; 295: 58–64.
- Schulze F, Lenzen H, Hanefeld C et al. Asymmetric dimethylarginine is an independent risk factor for coronary heart disease: Results from the multicenter Coronary Artery Risk Determination investigating the Influence of ADMA Concentration (CARDIAC) study. *Am Heart J* 2006, 152:491–498.
- Schulz E, Jansen T, Wenzel P et al. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 1115-1126.
- Shearer JD, Richards JR, Mills CD et al. Differential regulation of macrophage arginine metabolism: A proposed role in wound healing. *Am J Physiol* 1997; 272: 181–190.
- Singh M, Padhy G, Vats P et al. Hypbaric hypoxia induced arginase expression limits nitric oxide availability and signaling in rodent heart. *Biochem Biophys Acta* 2014; 1840: 1817-1824.
- Smith HA CJ, Christian KG, Drinkwater DC et al. Nitric oxide precursors and congenital heart surgery: A randomized controlled trial of oral citrulline. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 132: 58–65.

- Socha HM, Romero MJ, Caldwell RB et al. Oral citrulline administration enhances NO-dependent vasodilation. *FASEB Exp Biol* 2006; 20(5):1125-1126.
- SOLVD Investigators. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. The SOLVD Investigators. *NEJM* 1991; 325(5): 293–302.
- SOLVD Investigators. Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. *NEJM* 1992; 327(10):685–691.
- Spolarics Z, Bond JS. Comparison of biochemical properties of liver arginase from streptozocin-induced diabetic and control mice. *Arch Biochem Biophys* 1989; 274: 426–443.
- Swedberg K, Pfeffer M, Granger C et al. Candesartan in Heart failure- Assessment of reduction in Mortality and morbidity: rationale and design. *J Card Fail* 1999; 5: 276-82.
- Sweitzer NK. What is an angiotensin converting enzyme inhibitor? *Circulation* 2003; 108(3):16–18.
- Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 1999; 79(1): 215-262.
- Tham KT, Bernado BC, Ooi JYY et al. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failiure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch Toxicol* 2015; 89(9): 1401-1438.
- Tsuei BJ, Bernard AC, Barksdale AR et al. Supplemental enteral arginine is metabolized to ornithine in injured patients. *J Surg Res* 2005; 123: 17–24.
- van de Poll MC, Soeters PB, Deutz NE et al. Renal metabolism of amino acids: Its role in interorgan amino acid exchange. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 185–197.
- Vardeny O, Miller R, Solomon SD. Combined neprilysin and renin-angiotensin system inhibition for the treatment or heart failure. *JACC Heart Fail* 2014; 2: 663-670.
- Vasquez-Vivar J, Martasek P, Whitsett J et al. The ratio between tetrahydrobiopterin and oxidized tetrahydrobiopterin analogues controls superoxide release from endothelial nitric oxide synthase: an EPR spin trapping study. *Biochem J* 2002; 362: 733–739.
- Vedanthan R, Seligman B, Fuster V. Global perspective on acute coronary syndrome: a burden on the young and poor. *Circ Res.* 2014; 114:1959–1975.

- Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* 2011; 17(11):1410-1422.
- Wang W, Hein TW, Zhang C et al. Oxidized low-density lipoprotein inhibits nitric oxide-mediated coronary arteriolar dilation by up-regulating endothelial arginase I. *Microcirculation* 2011; 18: 36–45.
- Wang XP, Zhang W, Liu XQ et al. Arginase I enhances atherosclerotic plaque stabilization by inhibiting inflammation and promoting smooth muscle cell proliferation. *Eur Heart J*. 2014; Apr;35(14):911-9.
- Weil J und Schunkert H. Pathophysiology of chronic heart failure. *Clin Res Cardiol* 2006; 95(4): 1-15.
- Wiesinger H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog Neurobiol* 2001; 64: 365–391.
- WHO: Top ten causes of death. WHO Mediacentre 2014; Fact Sheet N°310 (www.who.int/entity/mediacentre/factsheets/fs310/en/ - 36).
- Widimsky P, Wijns W, Fajadet J et al. European Association for Percutaneous Cardiovascular Interventions. Reperfusion therapy for ST elevation acute myocardial infarction in Europe: description of the current situation in 30 countries. *Eur Heart J* 2010; 31: 943–957.
- Wu G, Flynn NE, Flynn SP et al. Dietary protein or arginine deficiency impairs constitutive and inducible nitric oxide synthesis by young rats. *J Nutr* 1999; 129: 1347–1354.
- Wu G, Morris SM Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 1998; 336:1–17.
- Xu W, Kaneko FT, Zheng S et al. Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. *FASEB J* 2004; 18: 1746–1748.
- Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B et al. ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2013; 128(16): 1810–1852.
- Young MJ. Targeting the mineralocorticoid receptor in cardiovascular disease. *Expert Opin Ther Targets* 2013; 17(3): 321–331.
- Zannad F, McMurray JJ, Krum H et al. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *NEJM* 2011; 364(1): 11–21.

- Zhang C, Wu J, Xu X et al. Direct relationship between levels of TNF α expression and endothelial dysfunction in reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 2010; 105: 454-464.
- Zhu W, Chandrasekharan UM, Bandyopadhyay S et al. Thrombin induces endothelial arginase through AP-1 activation. *Am J Physiol* 2009; 298: 952-960.
- Ziolo MT, Bers DM. The real estate of NOS signaling: location, location, location. *Circ Res* 2003; 92: 1279– 1281.

8. Erklärung

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder ich habe diese 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

9. Anhang

9.1. Veröffentlichungen

Heidorn M, Frodermann T, Böning A, Schreckenber R, Schlüter KD. Citrulline Improves Early Post-Ischemic Recovery of Rat Hearts In Vitro by Shifting Arginine Metabolism From Polyamine to Nitric Oxide Formation. Clin Med Insights Cardiol 2018; 12:1179546818771908. doi: 10.1177/1179546818771908

9.2. Danksagung

Herrn Prof. K.-D. Schlüter danke ich für die Überlassung des Themas und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die nicht selbstverständlich ist.

Weiterer Dank gebührt Herrn Dr. Rolf Schreckenber, der mir sowohl bei technischen als auch bei inhaltlichen Fragestellungen mit Rat und Tat zur Seite stand.

Auch bei den technischen Assistenten/innen möchte ich mich herzlich bedanken. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht durchzuführen gewesen. Insbesondere Peter Volk gebührt Dank für die stoische Unterstützung am Langendorff-Apparat. Nadine Woitasky bin ich für die Einführung in Western Blot und Zappelzirkus sehr dankbar. Karin Westermann unterstützte mich wirkungsvoll beim Erlernen der PCR, dafür vielen Dank! Auch Hermann Holzträger möchte ich für die Unterstützung am konfokalen Mikroskop danken.

Auch bei Vanessa möchte ich mich für den privaten Rückhalt und die Diskussionen über diese Arbeit, die mir sehr geholfen haben, herzlich bedanken. Zudem möchte ich meinen Eltern, meiner Schwester und meiner gesamten Familie danken, ohne die ich nie so weit gekommen wäre.

Meiner ehemaligen Grundschullehrerin Frau Huntsche möchte ich an dieser Stelle auch kurz danke sagen: Ohne Ihre Gymnasialempfehlung, die nicht selbstverständlich war, hätte ich wahrscheinlich nie studiert. Danke!

10. Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACH	Acetylcholin
AD	Aortendruck
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AP-1	Aktivator Protein-1
Arg	Arginin postischämisch
ASL	Argininosuccinatlyase
ASS	Argininosuccinatsynthetase
AT-1-Blocker	Angiotensinrezeptor-1-Blocker
ATF-2	Activating transcription factor-2
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
B2M	β-2-Mikroglobulin
BH ₂	Dihydrobiopterin
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BNP	brain/ B-type natriuretic peptide
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAT	Kationischer Aminosäuretransporter
CaSR	Calcium sensing receptor
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat

CGRP	Calcitonin Gene related Peptide
CO I	Kollagen I
CO III	Kollagen III
Cpost	Citrullin postischämisch
CR	Coronary resistance
CV	Contraction velocity
DHE	Dihydroethidium
DiasD	diastolischer Druck
dL/L%	$(1 - \frac{\text{minimale Zelllänge}}{\text{maximale Zelllänge}}) \times 100\%$
dP/dt max	Maximum der 1. Ableitung der Funktion des Druckes nach der Zeit
dP/dt min	Minimum der 1. Ableitung der Funktion des Druckes nach der Zeit s
dsDNA	doppestrang DNA
ECL-Lösung	Enhanced-Chemilumineszenz-Detektions-Lösung
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
eRNA	extrazelluläre Ribonukleinsäure
F	Fluss
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
GTP	Guanosintriphosphat
HF	Herzfrequenz
HRPP	Horse radish peroxidase

HW/BW	<i>heart weight</i> <i>body weight</i>
ICAM	Intracellular Adhesion Molecule
IMD/ADM2	Intermedin, Adrenomedullin 2
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IR	Ischämie-Reperfusion
KHK	Koronare Herzerkrankung
LDiast	maximale Zelllänge
L-NAME	N ω -nitro-L-Arginin Methylester
L-NAME+Cp	N ω -nitro-L-Arginin Methylester + Citrullin postischämisch
LOX-1	lectin-like oxLDL scavenger receptor-1
LVDP	left ventricular developed pressure
MPTP	Mitochondrial permeability transition pore
NADPH	reduzierte Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NED	Naphtylethylendiamin
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stichstoffmonoxid
NOHA	N- ω -Hydoxy-Arginin
Nor-NOHA	N- ω -Hydoxy-nor-Arginin
NOS	NO-Synthase
Nx	Normoxe Kontrolle
ODC	Ornithindekarboxylase

OAT	Ornithinaminotransferase
oxLDL	oxidiertes Low-Density Lipoprotein
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
PKB/Akt	Proteinkinase B
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
R 50%	Relaxation 50%
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RISK-Signalweg	Reperfusion injury salvage kinase- Signalweg
ROCK	Rho associated Protein Kinase
ROS	Reactive Oxygen Species
RPP	rate pressure product
RS	Reperfusionsschaden
RV	Relaxation velocity
Ryr2	Ryanodinrezeptor 2
SERCA 2a	Sarcoplasmic/ Endoplasmic reticulum calcium ATPase
SysD	Systolischer Druck
TACE	TNF- α Converting Enzyme
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
Thr	Threonin
TNF- α	Tumor Nekrosefaktor α
TTP	Time to peak