

**Die Rolle der p38 MAP-Kinase bei der  
Entstehung des myokardialen  
Ischämie/Reperfusionsschadens**

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

**Vorgelegt von Henning Pieper  
aus Münster (Westfalen)**

**Kiel 2008**

Aus dem Physiologischen Institut  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. H. M. Piper

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

Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Kracht

Tag der Disputation: 09.07.2009

## Inhaltsverzeichnis:

1 Einleitung .....	7
1.1 Der myokardiale Reperfusionsschaden .....	7
1.2 Energiestoffwechsel und Kationenhomöostase während myokardialer Ischämie und Reperfusion .....	8
1.3 Protektionsmechanismen gegen den myokardialen Reperfusionsschaden .....	9
1.4 Rolle der p38 MAP-Kinase .....	10
1.5 Verwendetes Modell .....	11
1.6 Ziel der Arbeit .....	12
2 Material .....	13
2.1 Chemikalien .....	13
2.2 Häufig verwendete Medien und Puffer .....	16
2.2.1 Zellkulturmedien .....	16
2.2.2 Perfusionsmedien .....	17
2.2.3 Puffer und Lösungen zur Elektrophorese .....	17
2.3 Geräte und Laborbedarf .....	19
3 Methoden .....	21
3.1 Herzmuskelzellisolierung .....	21
3.1.1 Versuchstiere .....	21
3.1.2 Herzmuskelzellpräparation .....	21
3.2 Zellkultur .....	22
3.3 Anoxie-, Reoxygenationsexperimente .....	23
3.3.1 Versuchsaufbau .....	23
3.3.2 Fluoreszenzmikroskopische Messungen zur Ermittlung der intrazellulären Ionenkonzentration von $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{H}^{+}$ und $\text{Mg}^{2+}$ .....	24
3.3.2.1 Ermittlung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2-AM und Kalibrierung des Fluoreszenzsignals .....	24
3.3.2.2 Ermittlung des intrazellulären pH-Wertes mittels des Fluoreszenzfarbstoffes BCECF-AM .....	25
3.3.2.3 Ermittlung der intrazellulären $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Mg-Fura-2-AM .....	26
3.3.3 Experimentelles Protokoll .....	27
3.3.4 Messparameter .....	27
3.4 Bestimmung der p38 MAPK-Phosphorylierung durch Protein- Gelelektrophoretische Methoden .....	28
3.4.1 Probennahme .....	28
3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	28
3.4.3 Western-Blot-Verfahren .....	29
3.4.4 Immunologische Nachweismethoden nach Western-Blot .....	29
3.4.5 Auswertung .....	30
3.5 Statistik .....	30

4 Ergebnisse .....	28
4.1 Veränderungen der Kationenhomöostase und der Zelllänge unter simulierter Ischämie (Anoxie) und Reperfusion (Reoxygenation) im Modell adulter Kardiomyozyten .....	31
4.1.1 ATP-Abbau und Rigorkontraktorentwicklung während Anoxie .....	31
4.1.2 Zytosolische pH-Wert Veränderung.....	32
4.1.3 Veränderung des zytosolischen Kalziums und der Zelllänge .....	32
4.2 P38 MAPK-Phosphorylierung während Anoxie und Reoxygenation und deren Beeinflussung durch SB 202190 und N-Acetylcystein in der Reoxygenationsphase .....	34
4.3 Einfluss des p38-Inhibitors SB 202190 und des Sauerstoffradikal-Fängers N-Acetylcystein auf die reoxygenationsinduzierte Hyperkontraktur, die zytosolische Kalzium-Homöostase und den pH-Wert.....	37
4.3.1 Beeinflussung der reoxygenationsinduzierten Hyperkontraktur.....	37
4.3.2 Beeinflussung des zytosolischen Kalzium-Verlaufs in der Reoxygenation.....	38
4.3.3 Beeinflussung der Oszillationsfrequenz.....	39
4.3.4 Beeinflussung der zytosolischen pH-Erholung durch SB 202190.....	41
5 Diskussion.....	42
5.1 Mechanismus der Interaktion von p38 MAPK und reoxygenationsinduzierter Hyperkontraktur unter Ischämie und Reperfusion.....	42
5.2 Schlussfolgerung .....	45
6 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	46
7 Summary.....	47
8 Literatur.....	48
9 Erklärung.....	56
10 Danksagung.....	57

## Abbildungsverzeichnis:

- Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung des Versuchsaufbaues. Unten ist das Perfusionssystem, oben die Apparatur für die fluoreszenzmikroskopischen Messungen dargestellt; Anregungslicht=blaue Linie, Emissionslicht=rote Linie 23
- Abbildung 2: Veränderung der  $Mg^{2+}$ -Konzentration (Mg-Fura-Ratio) und Zelllänge während Anoxie (exemplarischer Verlauf) 31
- Abbildung 3: Zytosolische pH-Wert Änderung während Anoxie und Reoxygenation (exemplarischer Verlauf) 32
- Abbildung 4: Fura-2 beladene Kardiomyozyten unter basalen Bedingungen (links), unter Anoxie (mitte) und am Ende der Reoxygenation (rechts). Die Farbkodierung drückt die zytosolische Kalziumkonzentration aus. Grün entspricht hierbei einem physiologischen Kalziumgehalt, rot einer Kalziumüberladung 33
- Abbildung 5: Exemplarischer Verlauf der Fura-2-Ratio und der Zelllänge in 60-minütiger Anoxie und folgender Reoxygenation. Fura-2-Ratio (—), Zelllänge (•—•) 33
- Abbildung 6: Exemplarischer Verlauf von Zelllänge (o---o) und Fura-2-Ratio (—) in Reoxygenation 34
- Abbildung 7: p38 MAPK-Phosphorylierung in Anoxie und Reoxygenation. Oben ist ein exemplarischer Blot dargestellt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=5 Western Blots; \*p < 0.05 versus Kontrolle) 35
- Abbildung 8: P38 MAPK-Phosphorylierung unter Kontrollbedingungen, unter Zugabe von SB 202190 (5  $\mu$ M) oder N-ACC (0,5 mM). Oben ist ein exemplarischer Blot dargestellt. Daten dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n =5 Western Blots; \*p < 0.05 versus Kontrolle, #p < 0.05 versus 5 min Reox) 36
- Abbildung 9: Zellverkürzung während der Reoxygenation unter Kontrollbedingungen, in Gegenwart von SB 202190 (5  $\mu$ M) oder N-ACC (0,5 mM). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=60; \*p < 0.05 versus Kontrolle) 37
- Abbildung 10: Zytosolische Kalziumerholung während der Reoxygenation unter Kontrollbedingungen, in Anwesenheit von SB 202190 (5  $\mu$ M) oder N-ACC (0,5 mM). Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=60) 38
- Abbildung 11: zeigt die Oszillationsfrequenz ( $\text{min}^{-1}$ ) während der frühen Reoxygenation bei 4 min unter Kontrollbedingungen, unter Anwesenheit von SB 202190 (5  $\mu$ M) oder N-Acetylcystein (0,5 mM). Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=60; \*p < 0.05 versus Kontrolle) 39
- Abbildung 12: Exemplarischer Verlauf der Fura-2-Ratio von SB 202190 gegenüber Kontrolle in der Reoxygenationsphase 40
- Abbildung 13: zeigt den Verlauf des zytosolischen pH-Wertes während der Reoxygenation unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von SB 202190

(5  $\mu\text{M}$ ). Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=12), (n=12, von 4 verschiedenen Rattenherzen an 4 verschiedenen Tagen).

# 1 Einleitung

## 1.1 Der myokardiale Reperfusionsschaden

Der Verschluss der KoronargefäÙe, der zu einer Ischämie am Herzen führt, und die immer häufiger durchgeführte akute Reperfusionstherapie in Form von PCI hat in den letzten Jahren zu intensiven Nachforschungen geführt, welche Folgen auf zellulärer Ebene mit diesem klinischen Ereignis korrelieren. Hierbei interessiert vor allem, ob es durch die Reperfusion zu einer zusätzlichen Schädigung am Myokardgewebe kommt und ob diese in der Reperfusion noch verhindert oder verringert werden kann.

Reperfusion von zuvor ischämischem Myokardgewebe kann noch nach Stunden zu Zelltod in Form von Nekrosebildung oder Apoptose führen (Umansky et al., 1995; Gottlieb et al., 1994). In der frühen Reperusionsphase, die die ersten Minuten umfasst, ist eine Hyperkontraktur der Kardiomyozyten einer der wichtigsten Gründe für die Ausbildung einer Myokardnekrose. Reperfundiertes Myokard weist dabei eine besondere Form der nekrotischen Gewebeschädigung auf, die als Kontraktionsbandennekrose bezeichnet wird (Fujiwara et al., 1989; Garcia-Dorado et al., 1992). Das Ausmaß der Kontraktionsbandennekrose korreliert mit dem Ausmaß makroskopischer myokardialer Schrumpfung, die in der frühen Reperusionsphase entsteht (Barrabes et al., 1996). Histologisch sieht man in diesen reperfundierten Herzen hyperkontrahierte Myofibrillen und eine Ruptur zellulärer Membranen (Piper et al., 2004).

Es wurde gezeigt, dass eine temporäre pharmakologische Blockade des kontraktiven Apparates in der frühen Reperusionsphase das Ausmaß der Kontraktionsbandennekrose und der InfarktgröÙe zu reduzieren vermag (Garcia-Dorado et al., 1992).

An isolierten Herzmuskelzellen kann das Elementargeschehen des frühen Reperfusionsschadens beobachtet und analysiert werden. Nach simulierter Ischämie und nachfolgender simulierter Reperfusion (im Modell isolierter Kardiomyozyten als Anoxie/Reoxygenation bezeichnet) kommt es zur Hyperkontraktur der Herzmuskelzellen. Diese ist charakterisiert als irreversible Zellverkürzung auf

30-40 % ihrer Ausgangslänge und Zellabrundung (Ladilov et al., 1999; Siegmund et al., 1990; 1991). Die Hyperkontraktur reoxygenerter Kardiomyozyten kann ebenfalls durch temporäre pharmakologische Blockade des kontraktilen Apparates verhindert werden (Siegmund et al., 1991).

## **1.2 Energiestoffwechsel und Kationenhomöostase während myokardialer Ischämie und Reperfusion**

Bei Ischämie, d.h. einer deutlichen Einschränkung oder völligen Unterbrechung der koronaren Durchblutung besteht ein Missverhältnis von Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf im Herzmuskelgewebe. Die mitochondriale Atmung wird in der Folge reduziert und kompensatorisch wird der Energiestoffwechsel auf Glykolyse umgestellt. Mit fortschreitender Ischämie wird die Deckungslücke im zellulären Energiebedarf größer und es kommt zum Abbau der zellulären Reserven von ATP und Phosphokreatin (Kupriyanov et al., 1995; Owens LM et al., 1996). Durch Bildung von Milchsäure und ATP-Abbau kommt es zum Abfall des zytosolischen pH-Wertes (Kupriyanov et al., 1995; Schäfer et al., 2000). Das zunehmende Energiedefizit bedingt eine Verlangsamung, bzw. einen Stillstand wichtiger metabolischer Funktionen. Die Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase nimmt ab und hierdurch kann das über verschiedene Mechanismen wie  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher,  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Symporter,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher oder  $\text{Na}^+$ -Kanäle in die Zelle gelangte  $\text{Na}^+$  nicht mehr entfernt werden. Infolgedessen kommt es zu einer zytosolischen  $\text{Na}^+$ -Akkumulation (Pike et al., 1993; Ladilov et al., 1995; Haigney et al., 1992). Durch das erhöhte intrazelluläre  $\text{Na}^+$  wird bei einer teildepolarisierten Zelle der „reverse mode“ des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers aktiviert, wodurch  $\text{Na}^+$  aus der Zelle hinaus und  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle hineintransportiert wird (Ladilov et al., 1999; Haigney et al., 1992). Als Folge kommt es zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung des Zytosols.

Im Modell der isolierten Kardiomyozyten lassen sich die Details der Reperfusionsphase analysieren: Wiederversorgung mit  $\text{O}_2$  und Substraten der zuvor Anoxiebedingungen ausgesetzten Myokardzelle führt schnell zu einer (teilweisen) Erholung der Kationenkontrolle.  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Na}^+$  fallen innerhalb von 10 min wieder auf das Initialniveau vor Anoxie ab, der pH-Wert reguliert sich innerhalb der gleichen Zeit



nahezu wieder auf Normalwert ein (Ladilov et al., 1995). Bezüglich des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts lassen sich 3 Teilphasen unterteilen.

1. Ein initialer schneller Abfall zu einem niedrigeren, aber noch erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Niveau, bedingt durch Sequestration von  $\text{Ca}^{2+}$  in das Sarkoplasmatische Retikulum (SR).
2. Das Auftreten von oszillierenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegen und -Abfällen, die auf eine repetitive Aufnahme und Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  durch das Sarkoplasmatische Retikulum zurückzuführen sind.
3. Der Abfall der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf Normalniveau durch den „forward mode“ des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (Siegmund et al., 1994).

Die Reenergetisierung in der Reoxygenationsphase bei erhöhtem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt und den darauf folgenden Oszillationen führt zu überschießender Kontraktion der Myofibrillen, der unmittelbaren Ursache der Hyperkontraktur der Zellen (Ladilov et al., 1999; Siegmund et al., 1990; 1991). Die Hyperkontraktur ist in der Regel irreversibel.

### **1.3 Protektionsmechanismen gegen den myokardialen Reperfusionsschaden**

In einer Reihe von Studien wurde gezeigt, dass die Hyperkontraktur in der frühen Phase der Reoxygenation noch verhindert oder verringert werden kann.

#### **1) Hemmung des kontraktiven Apparates**

Eine temporäre Blockade des kontraktiven Apparates mit BDM (2,3-Butanedione monoxime) in der Reoxygenationsphase vermag die Hyperkontraktur zu verhindern (Siegmund et al., 1991). Auch in vivo kann durch Applikation von BDM in der Reperusionsphase die kontraktile Funktion des Myokards verbessert und die Infarktgröße reduziert werden (Garcia Dorado et al., 1992).

#### **2) Azidose**

Es konnte gezeigt werden, dass eine längere Aufrechterhaltung der zytosolischen Azidose in der Reoxygenationsphase die Entwicklung der Hyperkontraktur signifikant reduziert. Erstens sind die Kardiomyozyten in Phase 1 der  $\text{Ca}^{2+}$ -Erholung trotz hohem Kalziumgehalt und wiederkehrender Energetisierung durch die pathophysiologisch auftretende Azidose gegenüber einer Hyperkontraktur geschützt

(Siegmund et al., 1997). Zweitens konnte gezeigt werden, dass eine verzögerte pH-Erhölung in Phase 2 der  $\text{Ca}^{2+}$ -Erholung (durch gleichzeitige Inhibition des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Exchangers und des  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Symporters) die Kalziumoszillationen und die Hyperkontraktur signifikant reduziert (Ladilov et al., 1995; Schäfer et al., 2000). Der Schutz ist einerseits auf eine Desensitivierung des kontraktiven Apparates gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$ , andererseits auf eine Hemmung des SR durch die Azidose zurückzuführen.

### 3) Beschleunigte $\text{Ca}^{2+}$ -Elimination

Abdallah et al. (2005) konnten zeigen, dass eine schnellere  $\text{Ca}^{2+}$ -Elimination im Zytosol reperfundierter Kardiomyozyten zur Reduktion des myokardialen Reperfusionsschadens bzw. der Hyperkontraktur führt. Die schnellere Elimination kann durch Aktivierung von SERCA durch vorherige Stimulation des cGMP-Signalweges erzielt werden. Auch in Versuchen am Schweineherzmodell konnte dies bestätigt werden, da Urodilatin, welches das cGMP intrazellulär erhöht, in der Reperfusion gegeben zu signifikanter Abnahme der Infarktgröße führt (Padilla et al., 2001).

## 1.4 Rolle der p38 MAP-Kinase

Eine Reihe von Arbeiten zeigten, dass während der Reperfusion bestimmte Proteinkinasen aktiviert werden, die am reperfusionsinduzierten Zelltod nachweislich beteiligt sind. In diesem Zusammenhang scheint die p38 MAP-Kinase eine besondere Rolle zu spielen. Einige Arbeiten demonstrierten, dass eine Hemmung der p38 MAPK-Aktivität in Ischämie und Reperfusion am in vivo Modell zu zellprotektiven Effekten führt.

Die p38 MAPK gehört zur Familie der mitogen aktivierten Proteinkinasen, zu denen auch die „signal regulated kinase“ (ERK) und die „c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminal protein kinase“ (JNK), auch „stress-activated protein kinase“ (SAPK) genannt, gehören. Alle diese MAP-Kinase-Mitglieder werden durch zweifache Phosphorylierung an Tyrosin (Tyr)- und Threonin (Thr)-Resten aktiviert. Sie scheinen eine wichtige Rolle in der Weiterleitung von Signalen von der Zellmembran zum Transkriptionsapparat zu spielen und sind an Prozessen wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung und

Zelltransformation beteiligt (Mansour et al., 1994; Leppa et al., 1998). Die p38 MAPK wird durch mehrere Arten zellulären Stresses, wie Ischämie, Reperfusion, Hitzeschock, UV-Bestrahlung, osmotischer Schock und entzündungsauslösende Zytokine aktiviert. Ihre Aktivierung scheint in vielen Zelltypen am Zelltod beteiligt zu sein.

Es wurde gezeigt, dass es in Kardiomyozyten zu einer p38 MAPK-Aktivierung unter Ischämie und zu einer weiteren Aktivitätssteigerung unter Reperfusion kommt (Yoshinori et al., 1997; Xin L. Ma et al., 1999; Tian-Li Yue et al., 2000; Bogoyevitch et al., 1996; Anu Punn et al., 2000). Wird die p38 MAPK in Ischämie und Reperfusion gehemmt, so führt dies sowohl zu einer Reduktion apoptotischer Zellen in vitro (Tian-Li Yue et al., 2000), als auch der Infarktgröße im in-vivo-Modell (Barancik et al., 2000). Interessant ist, dass eine Hemmung der p38 MAPK nur während der Reperusionsphase das Nekroseareal zu reduzieren und die Erholung kardialer Funktionen zu verbessern scheint (Xin L. Ma et al., 1999).

Die p38 MAPK wird durch reaktive Sauerstoffspezies aktiviert (Andre Kulisz et al., 2002; Clerk et al., 1998). Diese werden in Ischämie (Duranteau et al., 1998), und in noch höherem Ausmaß in der Reperfusion gebildet (Terry et al., 1997). Die Aktivierung der p38 MAPK während Ischämie/Reperfusion konnte durch Sauerstoffradikalfänger inhibiert werden (Clerk et al., 1998; Andre Kulisz et al., 2002). Auch konnte in einigen Arbeiten in vivo kardioprotektive Effekte durch Gabe von Radikalfängern (u.a. mit N-Acetylcystein) in der Ischämie- und Reperusionsphase gezeigt werden (Werns et al., 1985; Jolly et al., 1984; Terry et al., 1997, Ambrosio et al., 1987), in anderen jedoch ist dieser kardioprotektive Effekt nicht bestätigt worden (Uraizee et al., 1987).

## **1.5 Verwendetes Modell**

Bei dem Modell handelt es sich um ein Modell isolierter Kardiomyozyten aus der adulten Ratte, die einer simulierten Ischämie und Reperfusion (Anoxie/Reoxygenation) ausgesetzt werden. Dieses Modell wurde gewählt, da es sehr gut geeignet ist, Veränderungen der Ionenhomöostase und Veränderungen im Zellstoffwechsel direkt auf zellulärer Ebene zu analysieren, und mit der in der Reoxygenation auftretenden Hyperkontraktur in kausalem Zusammenhang zu setzen.

An diesem Modell wurden bereits viele der oben beschriebenen pathophysiologischen Veränderungen in Ischämie/Reperfusion untersucht. Von Vorteil erwies sich hierbei, dass die Kardiomyozyten keinen Zugkräften ausgesetzt sind und die sarkolemmale Integrität auch bei starken morphologischen Veränderungen erhalten bleibt. Dies macht es möglich, Veränderungen des Stoffwechsels und der Ionenhomöostase zu bestimmen (Siegmond et al., 1992).

### **1.6 Ziel der Arbeit**

Das zentrale Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Bedeutung der p38 MAPK für den Ischämie/Reperfusionsschaden von Myokardzellen.

Hierzu wurde analysiert,

1. ob eine p38 MAPK-Aktivierung in Kardiomyozyten unter simulierter Ischämie/Reperfusion stattfindet.
2. ob die Aktivierung der p38 MAPK in der Reperfusion durch Radikal-abhängige Ursachen ausgelöst wird.
3. ob die Hemmung der p38 MAPK-Aktivität in der Frühphase der Reperfusion sich auswirkt auf die Entwicklung der Hyperkontraktur, der zytosolischen Kalzium-Homöostase und des zytosolischen pH-Wertes der Kardiomyozyten.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Albumin (aus Rinderserum)	Roche Applied Science, Mannheim
2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)- carboxyfluorescein, acetoxymethylester (BCECF,AM)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Kollagenase, Typ CLS II,(322U/mg)	Biochrom KG, Berlin
Cystein	Sigma, Taufkirchen
EGTA	Sigma, Taufkirchen
Fura-2-AM	Molecular Probes, Leiden NL
Hepes	Roche Applied Science, Mannheim
Medium 199	Biochrom, Berlin
N <sub>2</sub>	Messer Griesheim, Krefeld
N-Methylglucamin	Sigma, Taufkirchen
Resazurin	Sigma, Taufkirchen
SB 202190	Calbiochem, Bad Soden

N-Acetyl-L-Cysteine	Sigma, Taufkirchen
BCECF-AM	Molecular Probes, Leiden NL
Tris	Roth, Karlsruhe
Na-monovanadat	Merck, Darmstadt
SDS (Dodecylsulfate Na-salt)	Serva, Heidelberg
MetOH	Merck, Darmstadt
HCL	Roth, Karlsruhe
3-Mercapto-1,2-Propandiol	Merck, Darmstadt
Benzonase	Sigma, Steinheim
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
N,N-Methylen-bis-Acrylamid	Roth, Karlsruhe
NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid)	Applichem, Darmstadt
Antikörper: Anti-rabbit IgG	Sigma, Steinheim
Triton X-100	Serva, Heidelberg
NaCl	Roth, Karlsruhe
6-Aminohexansäure	Merck, Darmstadt

MgCl <sub>2</sub>	Fluca, Buchs, Schweiz
Tween 20	Applichem, Darmstadt
BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)	Applichem, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
APS (Amoniumpersulfat)	Serva, Heidelberg
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamine)	Sigma, Steinheim
Glycin	Roth, Karlsruhe
BSA	Sigma, Steinheim
Anti-p38 MAPK	Sigma, Steinheim
Anti-Phospho-p38 MAPK	Sigma, Steinheim
Protein-Molekulargewichts-Marker	New England Biolabs, MA, USA

Die übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Calbiochem, Sigma, Roche Applied Science, Invitrogen (Eggenstein) und VWR (Darmstadt) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen.

Alle verwendeten Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

## 2.2 Häufig verwendete Medien und Puffer

### 2.2.1 Zellkulturmedien

<b>CCT/HEPES-Stammlösung:</b>	Medium 199/HEPES-Stammlösung	9,8 g/l
	HEPES	36 g/l
	Kreatin	5 mM
	Karnitin	2 mM
	Taurin	5 mM

Diese Lösung wurde auf pH 7,4 titriert.

#### **Vorplattierungsmedium:**

CCT/HEPES-Stammlösung +	
FCS	4% (vol/vol)
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	10 µg/ml

#### **Ausplattierungsmedium:**

CCT/HEPES-Stammlösung +	
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	10 µg/ml

Alle Medien wurden sterilisiert und bei 4 °C aufbewahrt.



### 2.2.2 Perfusionsmedien

Die in unseren Experimenten verwendeten Perfusionsmedien werden im Folgenden beschrieben.

#### **Normoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung (Normoxie-/Reoxygenationsmedium):**

Zusammensetzung (in mM/L): NaCl (125,0), KCl (2,6),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,2),  $\text{MgSO}_4$  (1,2),  $\text{CaCl}_2$  (1,0), HEPES (25,0), Glucose (2,5), pH-Wert 7,4

Die Lösung wurde bei 37 °C mit 1 N NaOH auf pH 7,4 titriert.

#### **Anoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung (Anoxiemedium):**

Zusammensetzung (in mM/L): NaCl (125,0), KCl (2,6),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,2),  $\text{MgSO}_4$  (1,2),  $\text{CaCl}_2$  (1,0), HEPES (25,0)

Die Lösung wurde bei 37 °C mit 1 N NaOH auf pH 6,4 titriert.

Das Anoxiemedium wurde nach der von Allshire et al. (1987) beschriebenen Methode autoklaviert. Zuvor wurde dem Medium der Redoxindikator Resazurin (1 % vol/vol) und Cystein (5,0 mM) hinzugegeben und danach solange mit  $\text{N}_2$  begast, bis ein Farbumschlag von lila nach rosa sichtbar wurde. Anschließend wurde das Medium in dampfdrucktauglichen Gefäßen für 40 min bei 2 bar und 120 °C autoklaviert, um einen Sauerstoffpartialdruck von  $< 22 \mu\text{Pa}$  zu erreichen.

### 2.2.3 Puffer und Lösungen zur Elektrophorese

AA/Bis-Stammlösung (30/0,75) oder (30/0,3): Acrylamid 29,25 % (wt/vol), Bisacrylamid 0,75 % (wt/vol) oder 0,3 % (wt/vol)

Anodenpuffer: Tris 30 mM (pH-Wert: 10,4), Methanol 20 % (vol/vol)

Erst-Antikörper-Lösung: p38 MAPK-AK (aus Kaninchen) 2,5 µg/ml oder phosphorylierter p38 MAPK-AK (aus Kaninchen) 2,5 µg/ml, BSA 2 % (wt/vol), Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 0,05 % (vol/vol)

Kathodenpuffer: Tris 25 mM (pH-Wert 9,4), 6-Aminohexansäure 40 mM, Methanol 20 % (vol/vol)

Konzentrierter Anodenpuffer: Tris 300 mM (pH-Wert: 10,4), Methanol 20 % (vol/vol)

Laufpuffer (SDS-Page): Glycin 1,44 % (wt/vol), Tris 0,3 % (wt/vol), SDS 0,1 % (wt/vol)

Lysispuffer: Tris/HCl 50 mM (pH-Wert: 6,7), SDS 2 % (wt/vol), Natriumvanadat 10 % (wt/vol), Mercaptopropandiol 20 % (wt/vol)

Gefärbter Protein Marker (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)

Sammelgel-Lösung (2 %): H<sub>2</sub>O 6,4 ml, AA/Bis-Stammlösung (30/0,75) 1,2 ml, Sammelgelpuffer (0,5 mol/l Tris, pH 6,8) 2,5 ml, SDS 10 % (wt/vol) 100 µl, TEMED 12 µl, APS 10 % (wt/vol) 50 µl

Substratpuffer: Tris/HCl 100 mM (pH-Wert: 9,5), MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 10 mM, NBT 0,0005 % (wt/vol), BCIP 0,00025 % (wt/vol)

TBS (Tris Buffered Saline): Tris/HCL 10 mM, NaCl 150 mM, pH Wert 7,4

Trenngel-Lösung (12,5 %): H<sub>2</sub>O 9 ml, AA/Bis-Stammlösung (30/0,3) 11,25 ml, Trenngelpuffer (1,5 mol/L Tris, pH 8,6) 6,7 ml, SDS 10 % (wt/vol) 270 µl, TEMED 22,5 µl, APS 10 % (wt/vol) 180 µl

Zweit-Antikörper-Lösung: Anti-Kaninchen IgG 1 µg/ml, BSA 2 % (wt/vol), Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 0,05 % (vol/vol)

## 2.3 Geräte und Laborbedarf

### Zellkultur und Herzmuskelzellisolierung:

Brutschrank	Kendro, Hanau
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Gewebehacker	Harvard Apparatus über Hugos Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Langendorff-Apparatur	Eigenbau
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Präparationsbesteck	Eickenmeyer, Tuttlingen
Sterilbank	Kendro, Hanau

### Fluoreszenzmessungen:

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

### Anoxie-Reoxygenationsexperimente:

Dampfdruckkochtopf	All American, Canada
Druckstabile Glasgefäße mit verschliessbarem Deckel	Bormioli Rocco, Italien
Edelstahlkapillaren	Latek, Eppelheim
Gasdichte Schläuche	Kahlensee, Gießen
Gasventile	Kahlensee, Gießen
Peristaltikpumpe	Gilson-Abimed, Langenfeld
Perfusionskammer	Eigenbau

**Western Blots:**

Blotkammer	Biotech. Fisher, Reiskirchen
Blotpapier	Biotech. Fisher, Reiskirchen
Cell Scraper	Costar, NY, USA
Elektrophoresekammer (Hoefer SE600 Series)	Amersham Pharmacia Biotech., San Francisco, CA, USA
PenStrep	Gibco/Invitrogen, NJ, USA
PVDF Membran	Millipore, Bedford, MA, USA
Zellkulturschalen (35 x 10 mm)	Falcon, NJ, USA

**Weitere Geräte:**

Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
Inkubator	Kendro, Hanau
Perfusionsheizung	Eigenbau
Pipetten	Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg
pH-Meter	WTW, Weinheim
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn
Zentrifugen	Haraeus, Hanau

**Verbrauchsmaterialien:**

Kulturschalen, Typ Falcon 3001	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf-Nethler- Hinz, Hamburg

## 3 Methoden

### 3.1 Herzmuskelzellisolierung

#### 3.1.1 Versuchstiere

In unserem Modell wurden Herzmuskelzellen adulter 200-300 g schwerer Wistar Ratten verwendet, die im Tierstall des Physiologischen Institutes gezüchtet wurden und freien Zugang zu Nahrung (Atromin) und Wasser hatten.

#### 3.1.2 Herzmuskelzellpräparation

Die Isolierung der Herzmuskelzellen fand nach der von Piper et al. (1982) beschriebenen Methode statt.

Als Lösungen wurden verwendet:

<b>Ca<sup>2+</sup>-Stammlösung:</b>	CaCl <sub>2</sub> (100,0 mM/L)
<b>Powell-Medium:</b>	NaCl (110,0 mM/L), NaHCO <sub>3</sub> (25,0 mM/L), KCl (2,6 mM/L), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1,2 mM/L), MgSO <sub>4</sub> (1,2 mM/L), Glucose (11,0 mM/L)
<b>Kollagenasepuffer:</b>	Powell-Medium (50 ml), Kollagenase (20 mg), Ca <sup>2+</sup> -Stammlösung (12,5 µl)

Nach kurzer Ethernarkose wurden die Tiere durch Genickbruch getötet. Nach Öffnen des Brustraumes wurde das Perikard entfernt, Herz und Lunge angehoben, durch Scherenschlag vom Körper getrennt und sofort in eiskalte isotonische NaCl-Lösung gelegt. Hier wurden Gewebereste vom Herz abpräpariert und dieses danach mit der Aorta ascendens an eine Langendorff-Apparatur angeschlossen. Hier wurde es zunächst für kurze Zeit mit Powell-Medium retrograd perfundiert, um das in den Koronarien verbliebene Blut auszuwaschen. Anschließend wurde es bei einer Flussrate von 2-3 ml/min rezirkulierend mit Kollagenasepuffer perfundiert. Dann wurden die Ventrikel von den Vorhöfen abgeschnitten und das Ventrikelgewebe, erst mechanisch mit einem Gewebehacker, anschließend mit zwei Skalpellens manuell,

zerkleinert. Danach schloss sich eine zehnmünütige Inkubation des Gewebes in Rezirkulationspuffer an (37 °C). Die Mazeration der Kardiomyozyten wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit einer 5 ml Pipette unterstützt. Um restliche Zellaggregate zu entfernen wurde die Suspension durch ein Nylonnetz (0,2 mm Porengröße) gefiltert. Jetzt wurde die Zellsuspension bei 25×g für 3 min zentrifugiert. Das sich gebildete Pellet wurde nach Aufnahme in Powell-Medium (mit 200 µM CaCl<sub>2</sub>) ein zweites Mal bei 25×g für 2 min zentrifugiert. Dann wurde das Pellet in Powell-Medium, das 400 µM CaCl<sub>2</sub> enthielt, aufgenommen und durch Aufschütteln resuspendiert. Diese Suspension wurde, entsprechend der Anzahl der präparierten Herzen auf Reagenzgläser verteilt, die zuvor mit einer ca. 10 ml hohen Flüssigkeitssäule aus Powell-Medium beschickt worden waren. Nach erneuter Zentrifugation (25×g für 1 min) erhielt man eine Zellpopulation, die zu 70-80 % aus stäbchenförmigen, lebenden Kardiomyozyten bestand.

### **3.2 Zellkultur**

Die Kulturschalen wurden, um ein Anheften der Kardiomyozyten an den Glasdeckgläschen zu erreichen, über Nacht mit Vorplattierungsmedium (s. Kap. 2.2.1) beschickt, was unmittelbar vor dem Ausplattieren abgesaugt wurde. Im Ausplattierungsschritt wurde das zuletzt gewonnene Zell-Pellet vorsichtig in Ausplattierungsmedium aufgenommen (25 ml pro Herz) und auf die vorplattierten Schalen verteilt. Ein nach dem Absaugen des Ausplattierungsmediums auf das Deckgläschen gelegter Plastikring gewährleistete eine relativ dichte Anheftung der Herzmuskelzellen auf dem Deckgläschen. Nach einer vierstündigen Anheftungsphase (37 °C) wurde das Ausplattierungsmedium gewechselt, wobei abgerundete, tote Zellen entfernt wurden, sodass die letztendliche Kultur aus ca. 90 % stäbchenförmigen Kardiomyozyten bestand. Diese auf den Deckgläschen anhaftenden Kardiomyozyten konnten dann für unsere Anoxie-Reoxygenationsexperimente oder Western-Blot-Analysen genutzt werden.

### 3.3 Anoxie-, Reoxygenationsexperimente

#### 3.3.1 Versuchsaufbau

Für unsere Anoxie-, Reoxygenationsexperimente wurden die Deckgläschen mit den darauf haftenden Kardiomyozyten in eine Perfusionskammer eingebaut und diese danach gasdicht verschlossen. Die Medien wurden, mittels einer Peristaltikpumpe durch Edelstahlkapillaren mit einem Reservoir verbunden, mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min durch die Perfusionskammer gepumpt. Das anoxische Medium wurde während des Versuches mit N<sub>2</sub> begast. Die Temperatur in der Perfusionskammer betrug 37 °C.

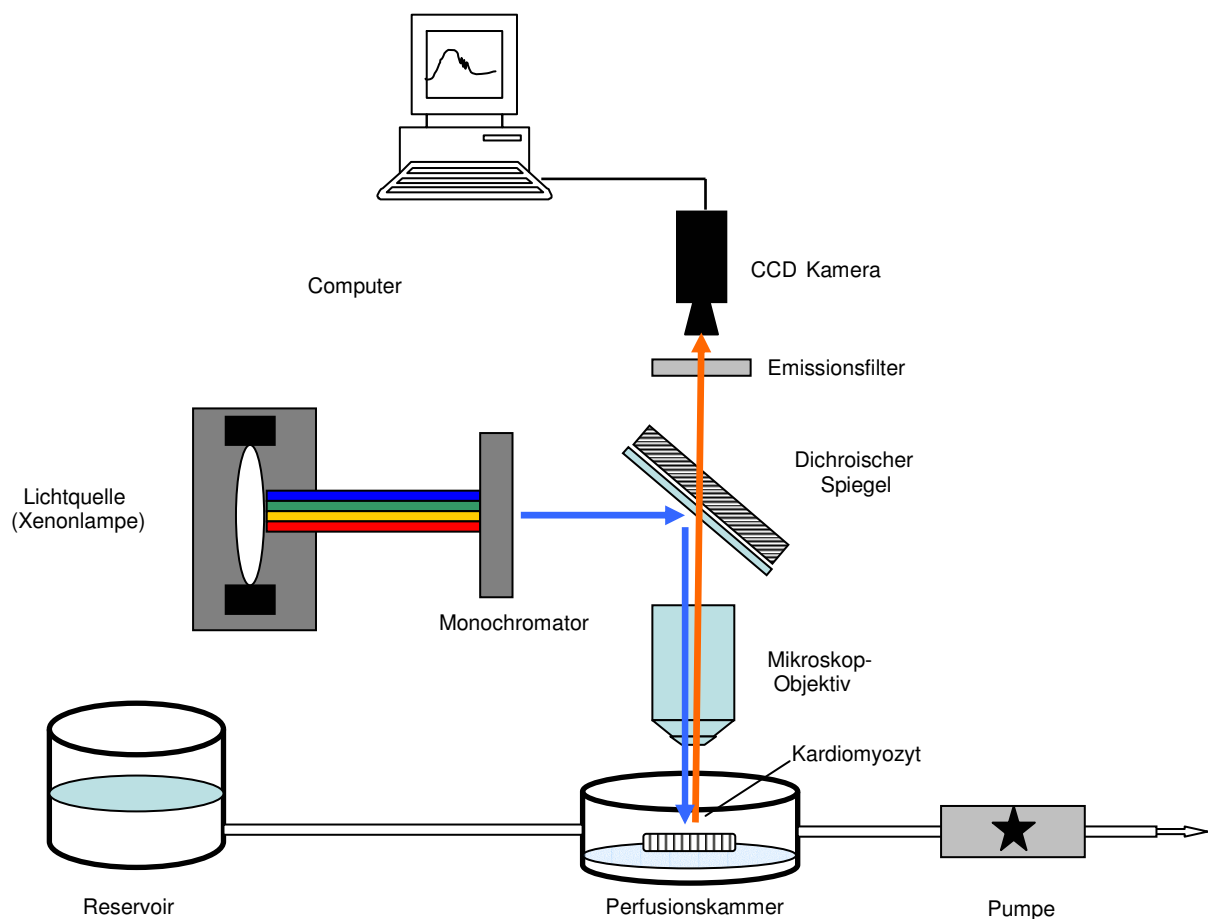


Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung des Versuchsaufbaues. Unten ist das Perfusionssystem, oben die Apparatur für die fluoreszenzmikroskopischen Messungen dargestellt; Anregungslicht=blaue Linie, Emissionslicht=rote Linie

### 3.3.2 Fluoreszenzmikroskopische Messungen zur Ermittlung der intrazellulären Ionenkonzentration von $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{H}^+$ und $\text{Mg}^{2+}$

Die Ionenmessungen wurden auf der Basis der Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Das von einer Xenonlampe generierte Licht wurde durch einen Monochromator soweit gefiltert, dass einwelliges Licht entstand, welches über einen Dichroismspiegel auf die mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen Zellen in der Perfusionskammer gelenkt wurde. Das von den Zellen ausgehende Fluoreszenzlicht gelangte durch ein inverses Mikroskop, den Dichroismspiegel und einen Emissionsfilter zu einer Kamera, die an ein Computersystem angeschlossen war. Die Daten der fluoreszenzmikroskopischen Messungen wurden, auf diese Weise zum Computer gelangt, vom Till-Vision-System ausgewertet.

#### 3.3.2.1 Ermittlung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2-AM und Kalibrierung des Fluoreszenzsignals

Zur intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsbestimmung wurden die Zellen zum Beladen für 30 min bei 37 °C in Ausplattierungsmedium (s. Kapitel 2.2.1) mit Fura-2-AM (2,5  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Fura-2-AM penetriert als Acetoxymethylester das Sarkolemm und wird von intrazellulären Esterasen gespalten, so dass es als geladenes Molekül die Zellwand nicht mehr passieren kann. Nach dieser Beladungszeit erfolgte eine 15-minütige Nachinkubation in Ausplattierungsmedium. Die Anregung von Fura-2-AM erfolgt mit den Wellenlängen 340 nm und 380 nm, das Emissionsmaximum liegt bei 510 nm. Die Daten der Fura-2-Messungen wurden als Ratio (340 nm/380 nm) wiedergegeben. Die Kalibrierung wurde nach dem von Li et al. (1987) beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Als Lösungen wurden verwendet:

**Kalibrierungslösung:** NaCl (10 mM), KCl (125 mM),  $\text{MgSO}_4$  (1 mM), HEPES (25 mM), Zusatz von:  $\text{CaCl}_2$  (3 mM) oder EGTA (5 mM); Ionomycin (5  $\mu\text{M}$ ), Nigericin (10 mg/l), pH 7,4 bei 37 °C, titriert mit 1 N KOH.

Um den  $R_{\text{max}}$ -Wert (maximales Ratio) zu ermitteln, wurden dem Perfusat 3 mM  $\text{CaCl}_2$  hinzugegeben, um den  $R_{\text{min}}$ -Wert (minimales Ratio) zu bestimmen 5 mM



EGTA. Um die freie zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu eruieren wurde folgende Formel (Grynkiewicz et al., 1985) angewandt:  $[\text{Ca}^{2+}] = \text{Kd} \times \text{b} \times (\text{R} - \text{Rmin}) / (\text{Rmax} - \text{R})$

**[Ca<sup>2+</sup>]:** Zytosolische Kalziumkonzentration

**R:** Fura-2-Ratio (340/380 nm)

**Rmax:** Maximales Ratio

**Rmin:** Minimales Ratio

**b:** Quotient aus Emissionsintensität der 380 nm Wellenlänge des Rmin-Wertes und der Emissionsintensität der 380 nm Wellenlänge des Rmax-Wertes

**Kd-Wert:** Maß für die Affinität von Fura-2 zu freien zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Dieser Wert ist abhängig vom pH-Wert. In vitro bestimmten Grynkiewicz et al. (1985) einen Kd-Wert für Fura-2 von 224 nmol/l. Entsprechend verschiedener pH-Werte konnten in Kardiomyozyten folgende Werte ermittelt werden:

pH-Wert	7,15	6,5
Kd-Wert	312 ± 9 nmol/l	337 ± 4 nmol/l

(nach Ladilov et al., 1997)

### 3.3.2.2 Ermittlung des intrazellulären pH-Wertes mittels des Fluoreszenzfarbstoffes BCECF-AM

Um die Zellen mit BCECF zu beladen, wurden diese für 15 min bei 37 °C in Ausplattierungsmedium (s. Kapitel 2.2.1) mit BCECF (1,2 µM) inkubiert, und danach für 30 min in Ausplattierungsmedium nachinkubiert. BCECF kann, nachdem als Acetoxymethylester in die Zelle gelangt, nach Esterabspaltung durch intrazelluläre Esterasen die Zellwand nicht mehr penetrieren. Der Fluoreszenzfarbstoff BCECF wird mit den Wellenlängen 440 und 490 nm angeregt, wobei das Emissionsmaximum bei 520 bis 560 nm liegt. Änderungen des pH-Wertes wurden als Änderung des BCECF-Ratios (490 nm/440 nm) wiedergegeben. Die Kalibrierung wurde nach der von Koop et al. (1992) beschriebenen Methode durchgeführt.

**Kalibrierungslösung:** NaCl (11,0 mM), KCl (124,0 mM),  $\text{MgCl}_2$  (1,0 mM), TES (30 mM) bzw. MES (30,0 mM) bzw. HEPES (30 mM), Nigericin (10 µg/ml)

Die unterschiedlichen Puffersubstanzen wurden je nach eingestelltem pH-Wert eingesetzt.

TES	pH 6,8- 8,2
MES	pH 5,5- 6,7
HEPES	pH 6,8- 8,2

Der pH-Wert der Lösung wurde mit KOH bei 37 °C eingestellt. Um den intrazellulären pH-Wert dem extrazellulären anzugleichen wurde das Protonophor Nigericin (10 µg/ml) verwendet.

### **3.3.2.3 Ermittlung der intrazellulären Mg<sup>2+</sup>-Konzentration mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Mg-Fura-2-AM**

Um Veränderungen der intrazellulären ATP-Konzentration während Anoxie und Reoxygenation zu ermitteln, wurde in den Versuchen die Mg-Fura-Ratio-Methode eingesetzt. Sie basiert darauf, dass bei der Hydrolyse von ATP Mg<sup>2+</sup> freigesetzt wird, und somit ein Anstieg der freien intrazellulären Mg<sup>2+</sup>-Konzentration mit einem Abfall der ATP-Konzentration korreliert (Leyssens et al., 1996). Vor Start der eigentlichen Anoxie-Reoxygenationsexperimente wurden die Kardiomyozyten für 30 min bei 37 °C mit Mg-Fura-2-AM (2,5 µM) in Medium 199 inkubiert. Mg-Fura-2-AM penetriert als Acetoxymethylester die Zellwand, wird intrazellulär von Esterasen gespalten, und kann als geladenes Molekül die Zelle nicht mehr verlassen. Die Anregung von Mg-Fura-2-AM erfolgt mit den Wellenlängen 340 nm und 380 nm, das Emissionsmaximum liegt bei 510 nm. Die Daten der Mg<sup>2+</sup>-Fura-2-Messung wurden als Ratio (340 nm/380 nm) wiedergegeben.

### 3.3.3. Experimentelles Protokoll

Zur Simulation von Ischämie und Reperfusion wurden die Kardiomyozyten für 40-70 min mit Anoxiemedium und anschließend für 15 min mit Reoxygenationsmedium perfundiert (s. Kap. 3.3). In der Reoxygenation wurden Aktivatoren oder Inhibitoren eingewaschen, die kurz in der folgenden Tabelle beschrieben werden. Auch in der Reoxygenation von Kardiomyozyten, die danach der Gelelektrophorese zugeführt wurden, wurden zu bestimmten Zeitpunkten diese Substanzen hinzugegeben.

Substanz	Konzentration	Eigenschaften
SB 202190	5 µmol	spezifischer p38 MAPK-Inhibitor
N-Acetyl L-cystein	0,5 mmol	Sauerstoff-Radikalfänger

### 3.3.4 Messparameter

Die folgenden Parameter wurden in den Experimenten bestimmt.

Parameter	Einheit	Methode
Zytosolischer Ca <sup>2+</sup> -Gehalt	In "arbitrary units" (a.u.) der Fura-2-Ratio oder als Absolutwerte	Fura-2
"Diastolische" und "Systolische" Ca <sup>2+</sup> -Werte	Maximalwerte und Minimalwerte der Oszillationen; in "arbitrary units" (a.u.) der Fura-2-Ratio	Fura-2
Ca <sup>2+</sup> -Oszillationen	Anzahl der Oszillationen/min	Fura-2
Zytosolischer pH-Wert	In "arbitrary units" (a.u.) der BCECF-Ratio oder als Absolutwerte	BCECF
Zelllänge	Zelllänge in % bezogen auf die Ausgangslänge	Zelllängenmessung

### **3.4 Bestimmung der p38 MAPK-Phosphorylierung durch Protein-Gelelektrophoretische Methoden**

#### **3.4.1 Probennahme**

Zur Probengewinnung wurden die Kardiomyozyten an den zuvor spezifizierten Zeitpunkten im Versuchsablauf mit einem Zellschaber vom Deckglas gelöst. Danach wurden sie für 10 min mit 200 µl Lysispuffer bei Raumtemperatur inkubiert (s. Material 2.2.3).

Zur Nukleinsäureverdauung wurde für weitere 10 min 10 µl Benzonase® (Endkonzentration 50 U/ml) hinzugefügt. Das Zelllysat wurde mit 10 % (vol/vol) einer Bromphenolblau (0,001 % wt/vol), Wasser/Glycerin-Lösung (1/1 vol/vol) versetzt. Anschließend wurden die Proben für 5 min auf 95 °C erhitzt, um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu erreichen.

#### **3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt.

Die zur Herstellung der Gele benötigten Substanzen (s. Material 2.2.3) wurden jeweils in einem Erlenmeyerkolben angesetzt und mit einer Wasserstrahlpumpe 5 min entgast. Die 12 % Trenngel-Lösung wurde, nachdem in die gesäuberte Gelkammer gegossen, mit destilliertem Wasser überschichtet. Dann polymerisierte das Gel für ca. 30-60 min, das Wasser wurde abgegossen und das Trenngel mit einer 2 % Sammelgel-Lösung überschichtet. Der sofort eingesetzte Gelkamm wurde nach 10 min Polymerationszeit gezogen. Anschließend wurde die Elektrophoresekammer mit Laufpuffer befüllt. Um die Position der untersuchten p38 MAPK aufgrund ihres Molekulargewichtes schon während der Gelelektrophorese abschätzen zu können, wurde ein gefärbter Protein-Molekulargewichtsmarker (zwischen 6,5 und 175 kDa) mit auf das Gel aufgetragen. Die SDS-Gelelektrophorese fand bei konstanter Spannung von 200 V über 3 h bei Raumtemperatur statt.

### 3.4.3 Western-Blot-Verfahren

Die Proteinbanden wurden im „Semi Dry Blotting“-Verfahren durch Elektrophorese auf Polyvinyliden-Difluorid (PVDF)-Membranen transferiert.

Hierzu wurde die PVDF-Membran mit 100 % Methanol benetzt und danach kurz mit Anodenpuffer gespült. Dann wurde die Anode der Western-Blot-Apparatur zuerst mit drei in konzentriertem Anodenpuffer getränkten, dann mit drei in Anodenpuffer getränkten Filterpapieren und schließlich mit der PVDF-Membran bestückt. Jetzt wurde das Gel, nach Lösen von der Glasscheibe der Gelkassette, aufgelegt. Zum Schluss wurden drei in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere und die Kathode der Apparatur aufgelegt (Puffer s. Material 2.2.3).

### 3.4.4 Immunologische Nachweismethoden nach Western-Blot

Um die unspezifischen Bindungsstellen für die später zum Einsatz kommenden Antikörper abzusättigen, wurden die PVDF-Membranen nach erfolgtem Proteintransfer für 1 h mit 3 % BSA in TBS geblockt. Nach zweimaligem Waschen für 5 min in TBS wurden die PVDF-Membranen 2 h mit dem jeweiligen Erst-Antikörper inkubiert. Der p38 MAPK- Antikörper ist gegen die Aminosäuresequenz Thr-Gly-Tyr der 38 kDa Form der MAP-Kinasen gerichtet, der pp38 MAPK-AK gegen pThr180 und pTyr182. Anschließend fanden zwei Waschgänge von je 10 min mit TBS und 0,1 % Triton statt. Nach der nun folgenden, 120 min dauernden Zweitantikörperinkubation wurden die Membranen erneut 3-malig gewaschen (zweimal 10 min mit TBS und 0,5 % Triton, dann 10 min mit einer Lösung aus Tris/HCl (100 mM, pH-Wert 9,5), MgCl<sub>2</sub> (5 mM) und NaCl (10 mM)).

Die Entwicklung der PVDF-Membranen fand in stark abgedunkelter Umgebung bei Raumtemperatur mit einem Substratpuffer statt, dem BCIP zugesetzt war, welches durch die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP) des Zweit-Antikörpers in ein violettes Präzipitat umgesetzt wird (Puffer und Antikörperlösungen s. Material 2.2.3).

Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Membranen in destilliertes Wasser überführt und nach 10 min Wässerung auf Filterpapieren an der Luft getrocknet.

### **3.4.5 Auswertung**

Gesamt p38 MAPK und phosphorylierte p38 MAPK wurden densitometrisch quantifiziert. Die statistischen Ergebnisse wurden als Verhältnis zwischen der aktivierten phosphorylierten Form der p38 MAP-Kinase gegenüber der gesamt p38 MAP-Kinase in Prozent dargestellt.

### **3.5 Statistik**

Ergebnisse der Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM von n verschiedenen Experimenten wiedergegeben.

Statistische Vergleiche wurden durch einfache Varianzanalyse (One way Anova) unter Nutzung des Student-Newman-Keuls-Tests für post-hoc Analysen durchgeführt. Unterschiede mit  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Veränderungen der Kationenhomöostase und der Zelllänge unter simulierter Ischämie (Anoxie) und Reperfusion (Reoxygenation) im Modell adulter Kardiomyozyten

#### 4.1.1 ATP-Abbau und Rigorkontraktorentwicklung während Anoxie

Um die pathophysiologischen Situationen von Ischämie und Reperfusion zu simulieren, wurden die isolierten Kardiomyozyten erst mit Anoxielösung (pH 6,4) und dann mit Reoxygenationslösung (pH 7,4) perfundiert (s. Methoden 3.4.1). Unter Anoxie entwickeln die Zellen bei abnehmendem ATP-Gehalt nach 10-20 min eine Rigorkontraktur, wobei sie sich auf 70 % ihrer Ausgangslänge verkürzen. Wie in Abb. 2 gezeigt, geht der ATP-Abbau der Rigorentwicklung unmittelbar voraus (Sigmund et al., 1990). Als Indikator für den ATP-Abbau wird hier die Änderung der freien  $Mg^{2+}$ -Konzentration mithilfe des Fluoreszenzindikators Mg-Fura angewandt, da das zytosolische ATP an  $Mg^{2+}$  gebunden ist und es beim ATP-Abbau zur Freisetzung von  $Mg^{2+}$  kommt (Budinger et. al., 1998).

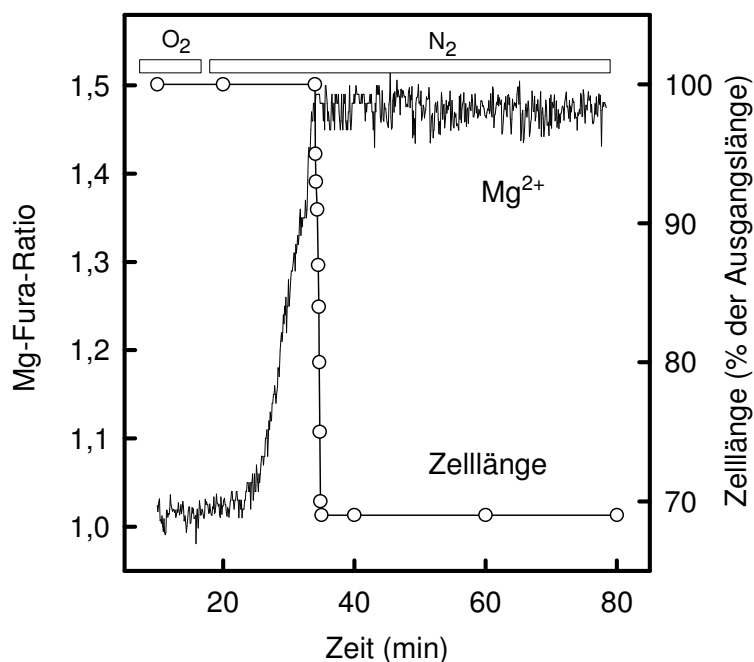


Abbildung 2: Veränderung der  $Mg^{2+}$ -Konzentration (Mg-Fura-Ratio) und Zelllänge während Anoxie (exemplarischer Verlauf)

#### 4.1.2 Zytosolische pH-Wert Änderung

Da unter Anoxie die intrazellulären Vorräte an ATP und Kreatinphosphat schnell aufgebraucht sind, weicht der Energiestoffwechsel der Zelle auf anaerobe Glykolyse aus. Hierbei entsteht Milchsäure, die zu Laktat und  $H^+$  dissoziiert und zu einer intrazellulären Azidose führt. Der unter normoxischen Verhältnissen vorherrschende intrazelluläre pH-Wert von  $7,12 \pm 0,04$  fällt unter Anoxie rasch ab, sodass nach 60 min ein pH von  $6,42 \pm 0,04$  vorliegt. Unter Reoxygenation und steigendem Energiegehalt erreichen die Kardiomyozyten innerhalb von ca. 15 min wieder annähernd ihren normoxischen pH-Wert. Abb. 3 zeigt den zeitlichen Verlauf des pH-Wertes während Anoxie und Reoxygenation.

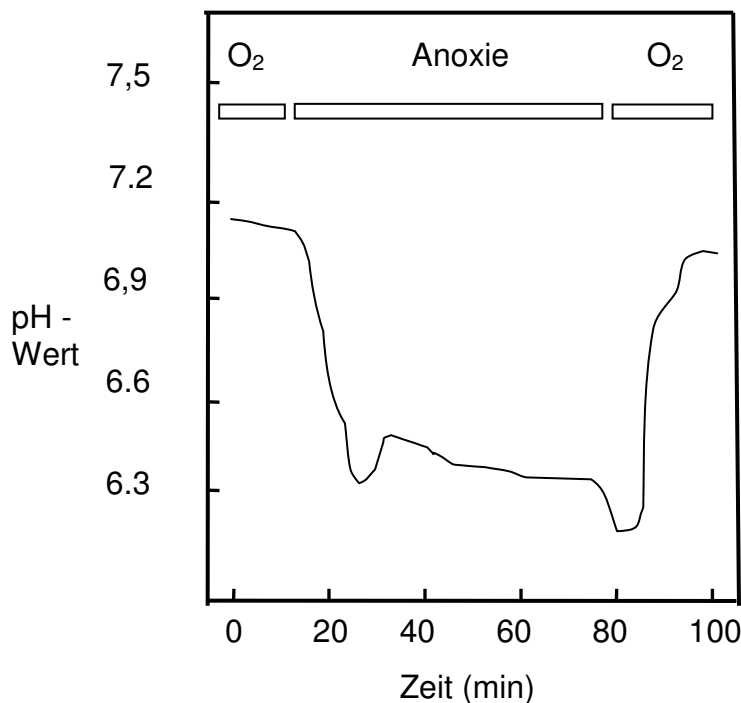


Abbildung 3: Zytosolische pH-Wert Änderung während Anoxie und Reoxygenation (exemplarischer Verlauf)

#### 4.1.3 Veränderung des zytosolischen Kalziums und der Zelllänge

Nach dem Rigoreintritt (s. Abb. 4 Mitte) unter Anoxie kommt es in den Zellen zu einer intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Überladung (s. Abb. 5). Hierbei steigt die Fura-2-Ratio auf Werte von  $4,10 \pm 0,20$  was einer  $Ca^{2+}$ -Konzentration von  $1,88 \pm 0,05 \mu M$  entspricht. Während der Reoxygenation entwickeln die Kardiomyozyten eine Hyperkontraktur



(Verkürzung der Zellen auf 30 % ihrer Ausgangslänge, s. Abb. 4 rechts) und die Fura-2-Ratio und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration fällt wieder auf Initialniveau ab (s. Abb. 5).

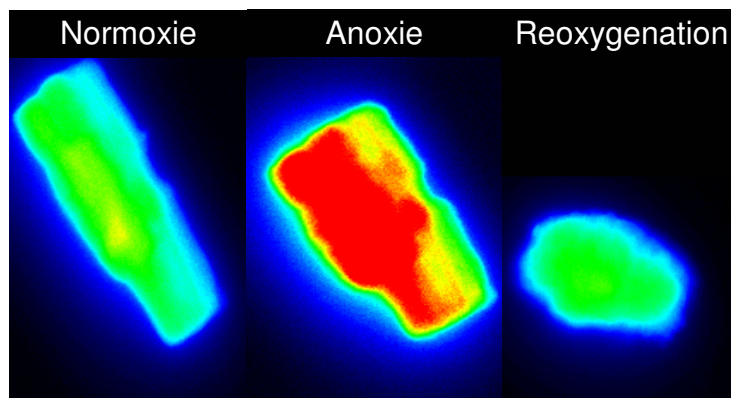


Abbildung 4: Fura-2 beladene Kardiomyozyten unter basalen Bedingungen (links), unter Anoxie (mitte) und am Ende der Reoxygenation (rechts). Die Farbkodierung drückt die zytosolische Kalziumkonzentration aus. Grün entspricht hierbei einem physiologischen Kalziumgehalt, rot einer Kalziumüberladung

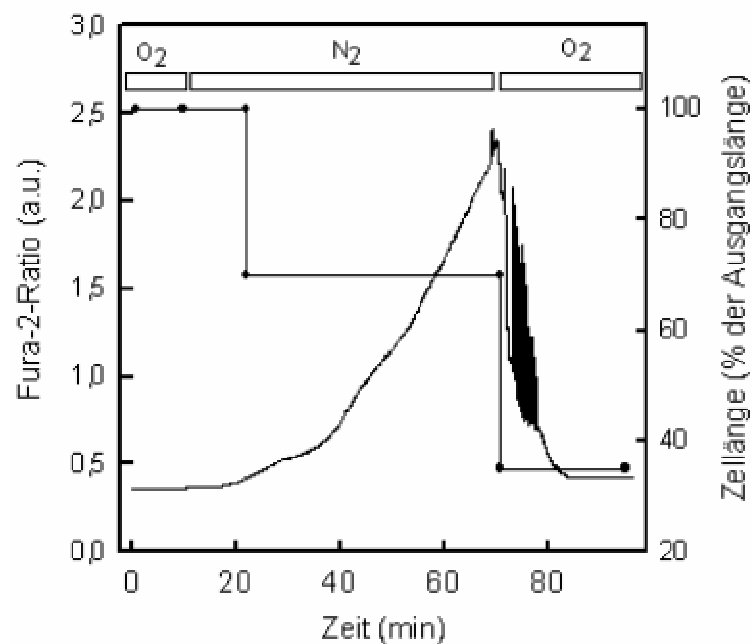


Abbildung 5: Exemplarischer Verlauf der Fura-2-Ratio und der Zelllänge in 60-minütiger Anoxie und folgender Reoxygenation. Fura-2-Ratio (—), Zelllänge (•—•)

Die Erholung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kontrolle in der Reoxygenation lässt sich in 3 Phasen einteilen, deren pathophysiologischen Ursachen schon zuvor erläutert wurden. Zunächst kommt es zu einer schnellen Abnahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, danach zum Auftreten von  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen, und schließlich zu einem weiteren

Absinken der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, sodass nach 10-15 min normoxische Werte erreicht werden (s. Abb. 6).

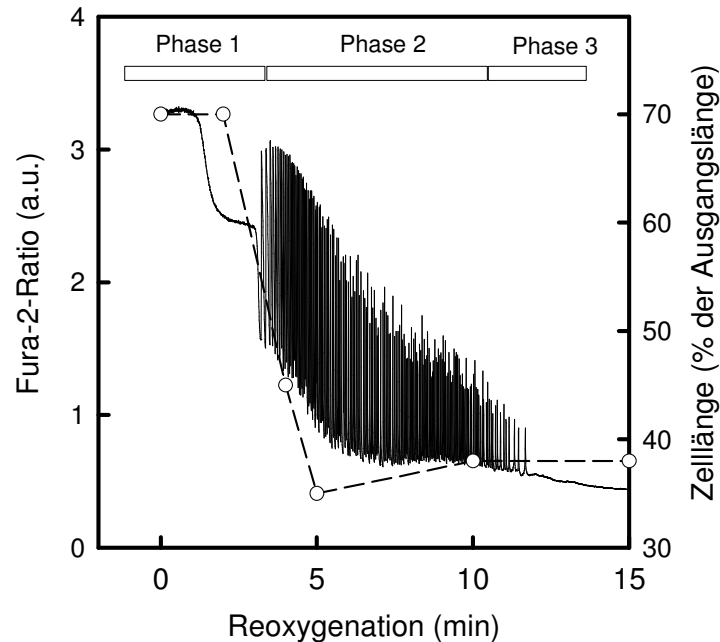


Abbildung 6: Exemplarischer Verlauf von Zelllänge (o---o) und Fura-2-Ratio (—) in Reoxygenation

#### 4.2 P38 MAPK-Phosphorylierung während Anoxie und Reoxygenation und deren Beeinflussung durch SB 202190 und N-Acetylcystein in der Reoxygenationsphase

Zunächst wurde der Aktivierungsstatus der p38 MAPK in Anoxie und Reoxygenation analysiert. Hierzu wurde die p38 MAPK-Phosphorylierung als Ausdruck ihrer Aktivierung im Western-Blot-Verfahren bestimmt. Diese wurde an verschiedenen Zeitpunkten während Anoxie und Reoxygenation bestimmt. Es wurden spezifische Antikörper gegen die an Thr<sup>180</sup> und Tyr<sup>182</sup> doppelt phosphorylierte p38 MAPK eingesetzt. Unter Anoxie kommt es zu einem stetigen Ansteigen des Phosphorylierungsgrades beginnend bei 5 min und einem Maximum bei 30 min Anoxie. In den ersten 5 min der Reoxygenation kommt es zu einem weiteren Ansteigen, jedoch nimmt dieser nach 10 min dann wieder ab (s. Abb. 7).

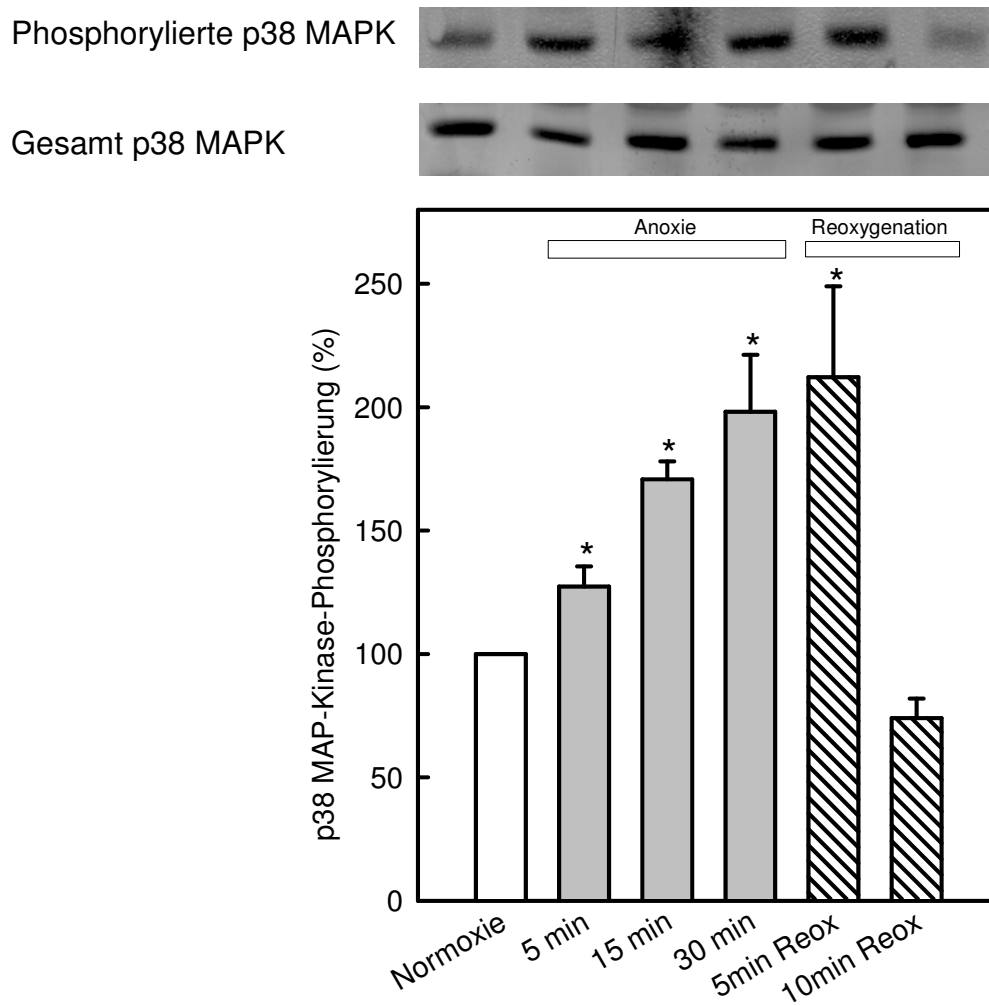


Abbildung 7: p38 MAPK-Phosphorylierung in Anoxie und Reoxygenation. Oben ist ein exemplarischer Blot dargestellt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=5 Western Blots; \*p < 0.05 versus Kontrolle)

Als weiterer Punkt wurde analysiert, ob es Möglichkeiten einer Hemmung der p38 MAPK in der Reoxygenation gibt. Der spezifische Inhibitor der p38 MAPK SB 202190 wurde dem Reoxygenationsmedium zugesetzt. Hierbei wurde festgestellt, dass es zu einer signifikanten Hemmung in der frühen Reoxygenationsphase kommt (s. Abb. 8). Diese Hemmung ist bei einer Konzentration von 5  $\mu$ mol am deutlichsten und kann durch höhere Konzentrationen nicht gesteigert werden. Da gezeigt wurde, dass es durch Sauerstoffradikale zu einer Aktivierung der p38 MAPK kommt (Andre Kulisz et al., 2002; Clerk et al., 1998), war von Interesse, ob durch Zugabe des Radikalfängers N-Acetylcystein (N-ACC) es auch zu einer Hemmung der p38 MAPK-Phosphorylierung kommt. Auch hierdurch kann eine signifikante

Hemmung des Phosphorylierungsgrades in der frühen Reoxygenationsphase erreicht werden (s. Abb. 8).

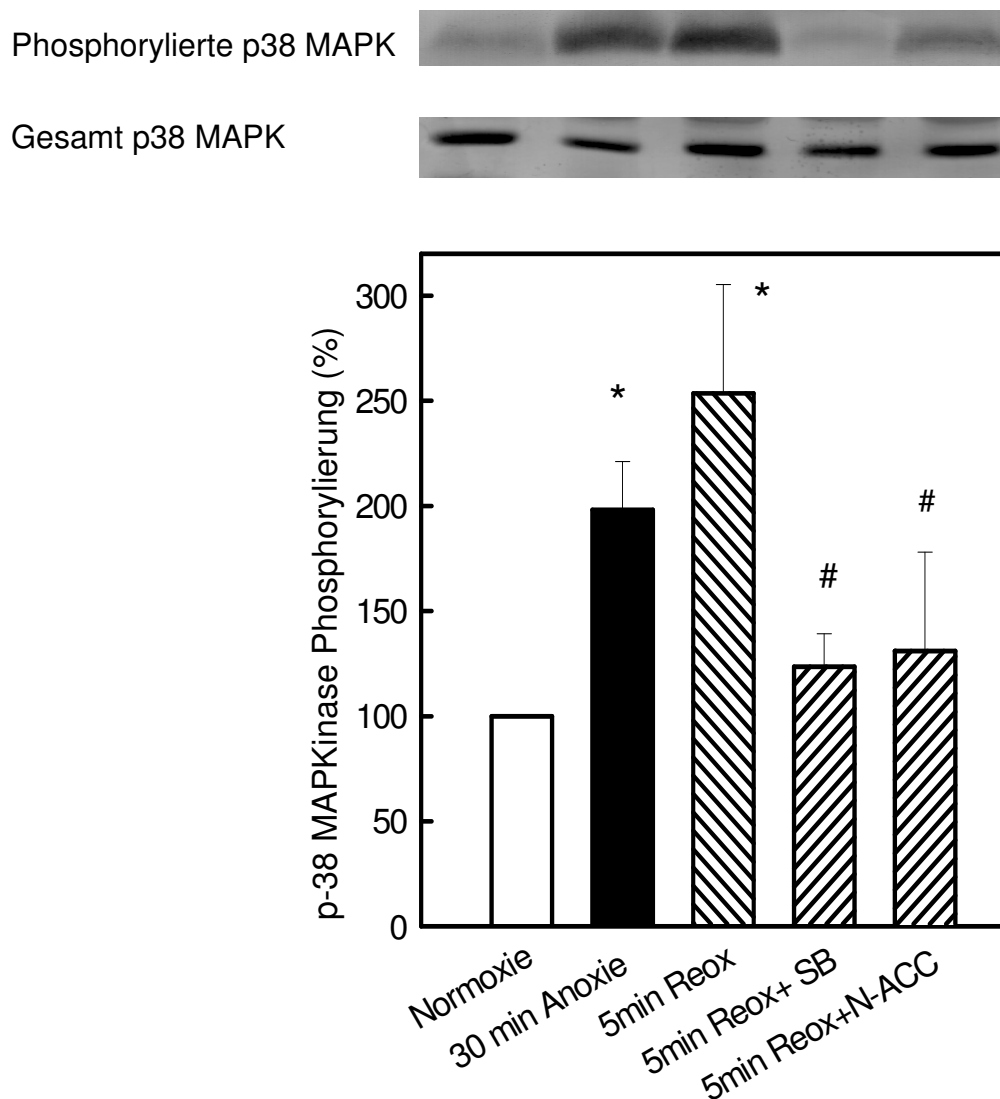


Abbildung 8: P38 MAPK-Phosphorylierung unter Kontrollbedingungen, unter Zugabe von SB 202190 (5  $\mu$ M) oder N-ACC (0,5 mM). Oben ist ein exemplarischer Blot dargestellt. Daten dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=5 Western Blots; \*p < 0.05 versus Kontrolle, #p < 0.05 versus 5 min Reox)

### 4.3 Einfluss des p38-Inhibitors SB 202190 und des Sauerstoffradikal-Fängers N-Acetylcystein auf die reoxygenationsinduzierte Hyperkontraktur, die zytosolische Kalzium-Homöostase und den pH-Wert

#### 4.3.1 Beeinflussung der reoxygenationsinduzierten Hyperkontraktur

In den vorherigen Messungen konnte bestätigt werden, dass die p38 MAPK in der Reoxygenation aktiviert ist. Im Folgenden wurde der Einfluss von SB 202190 und N-Acetylcystein auf die reoxygenationsinduzierte Hyperkontraktur geprüft. Abb. 9 zeigt den Verlauf der Zellverkürzung während der Reoxygenationsphase. Die unter Kontrollbedingungen auftretende massive Hyperkontraktur kann durch Zugabe von SB 202190 in der Reoxygenation nahezu völlig aufgehoben werden. Zu einer schwächeren, jedoch auch signifikanten Reduktion des Hyperkontrakturgrades kommt es durch Zugabe von N-Acetylcystein.

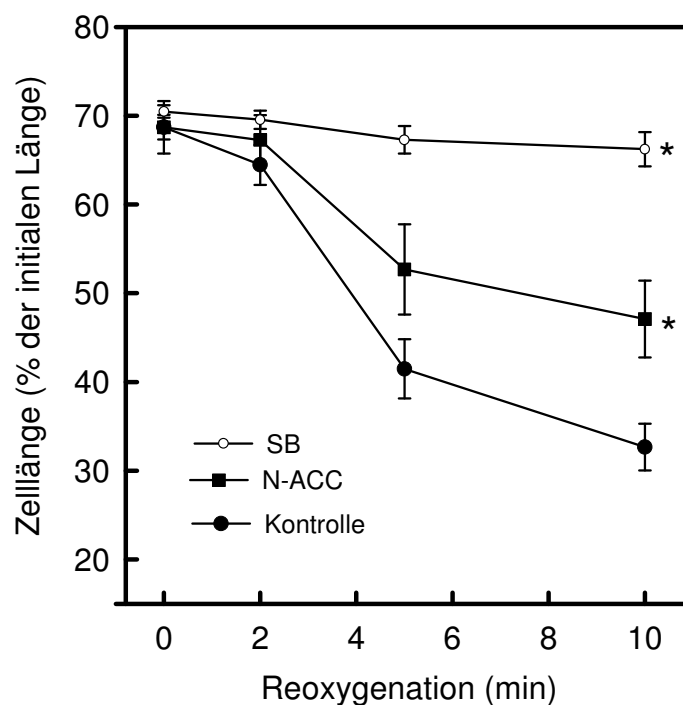


Abbildung 9: Zellverkürzung während der Reoxygenation unter Kontrollbedingungen, in Gegenwart von SB 202190 (5  $\mu$ M) oder N-ACC (0,5 mM). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=60; \*p < 0.05 versus Kontrolle)

### 4.3.2 Beeinflussung des zytosolischen Kalzium-Verlaufs in der Reoxygenation

Um festzustellen, ob die Hyperkontrakturhemmung in der Veränderung der Kalziumhomöostase begründet liegt, wurde die Kalziumkonzentration in der Reoxygenationsphase bestimmt. Es zeigen sich unter Kontrollbedingungen, unter Anwesenheit von SB 202190 und unter N-Acetylcystein keine signifikanten Unterschiede in der Erholungskinetik. Nach 10 min Reoxygenation werden Kalziumwerte wie vor Anoxie erreicht. In Abb. 10 ist die Kalzium-Erholungskinetik in der Reoxygenation dargestellt.

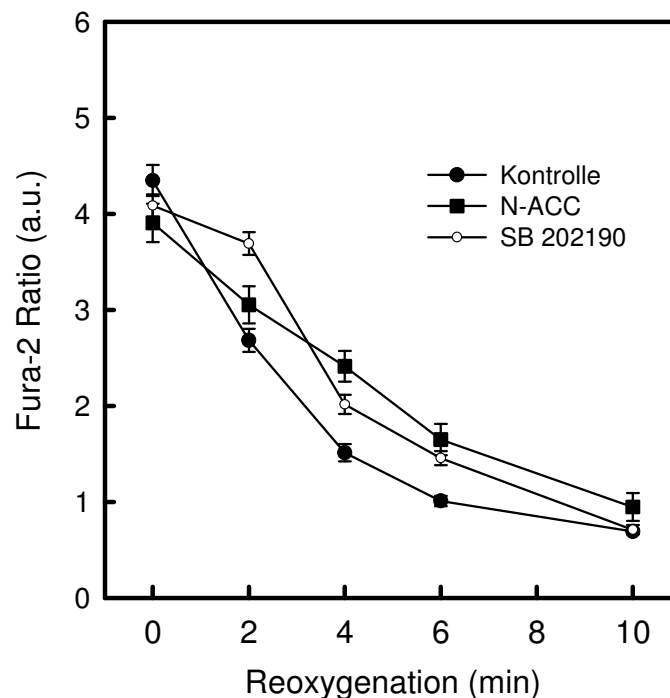


Abbildung 10: Zytosolische Kalziumerholung während der Reoxygenation unter Kontrollbedingungen, in Anwesenheit von SB 202190 (5  $\mu$ M) oder N-ACC (0,5 mM). Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=60)

### 4.3.3 Beeinflussung der Oszillationsfrequenz

Da die Oszillationen in der Reoxygenation zur Hyperkontraktur führen, könnte der Grund für eine Reduktion der Hyperkontraktur in einer Abnahme der Oszillationen zu suchen sein. Daher wurde untersucht, ob sich ihre Frequenz unter SB 202190 oder N-Acetylcystein verändert. In Anwesenheit von SB 202190 und auch N-Acetylcystein wurde eine signifikante Reduktion der Oszillationsfrequenz in der frühen Reoxygenation beobachtet (Abb. 11).

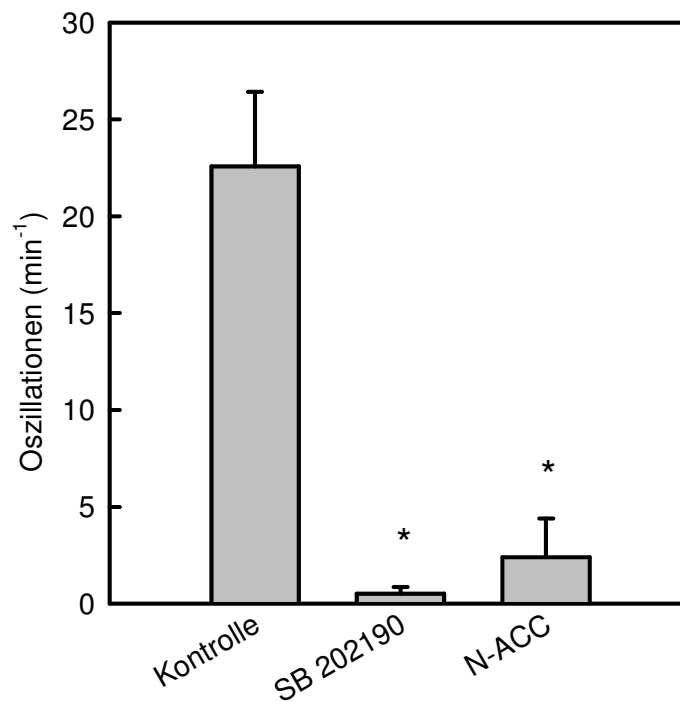


Abbildung 11: zeigt die Oszillationsfrequenz (min<sup>-1</sup>) während der frühen Reoxygenation bei 4 min unter Kontrollbedingungen, unter Anwesenheit von SB 202190 (5  $\mu$ M) oder N-Acetylcystein (0,5 mM). Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=60;\*p < 0.05 versus Kontrolle)

In Abb. 12 sieht man an einem exemplarischen Verlauf das völlige Ausbleiben von Oszillationen in der Reoxygenationsphase in Anwesenheit von SB 202190 gegenüber Kontrolle.

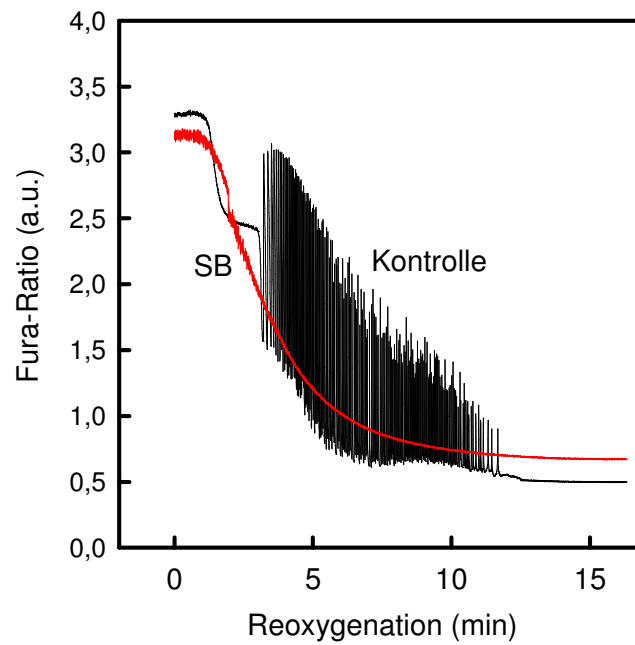


Abbildung 12: Exemplarischer Verlauf der Fura-2-Ratio von SB 202190 gegenüber Kontrolle in der Reoxygenationsphase



#### 4.3.4. Beeinflussung der zytosolischen pH-Erholung durch SB 202190

Unter normoxischer Perfusion liegt der pH-Wert bei  $7,12 \pm 0,04$  ( $n=12$ ), um dann in der Anoxiephase auf  $6,40 \pm 0,03$  ( $n=12$ ) abzufallen. Nach ca. 15 min Reoxygenation erreichen die Zellen dann wieder ihren präanoxischen pH-Wert. Um zu überprüfen, ob SB 202190 seine protektive Wirkung auf den Hyperkontrakturgrad über den Mechanismus einer verzögerten pH-Erholung entfaltet, wurden die pH-Werte in der Reoxygenationsphase gemessen. Abb. 13 zeigt, dass SB 202190 den Verlauf des pH-Wertes während der Reoxygenation nicht beeinflusst.

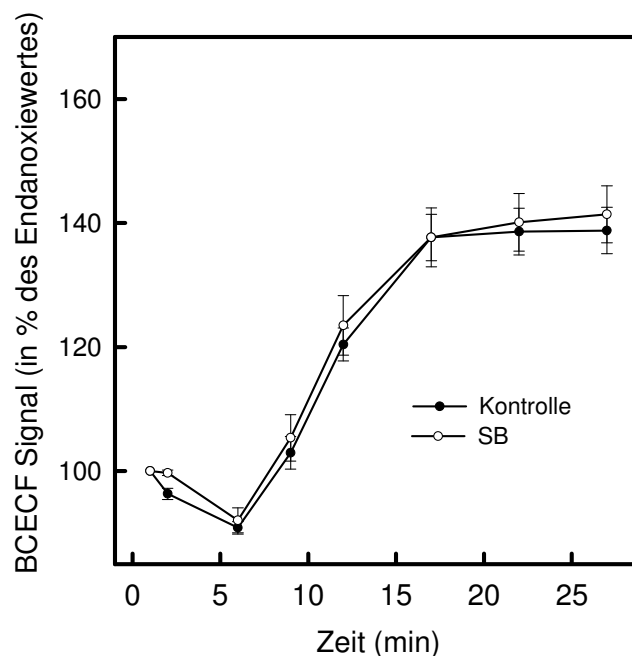


Abbildung 13: zeigt den Verlauf des zytosolischen pH-Wertes während der Reoxygenation unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von SB 202190 ( $5 \mu\text{M}$ ). Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=12$ , von 4 verschiedenen Rattenherzen an 4 verschiedenen Tagen).

## 5 Diskussion

### 5.1 Mechanismus der Interaktion von p38 MAPK und reoxygenationsinduzierter Hyperkontraktur unter Ischämie und Reperfusion

Das zentrale Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, auf welche Weise eine Hemmung der p38 MAPK in der frühen Reperfusionsphase gegen die reoxygenationsinduzierte Hyperkontraktur schützen kann. Bei der Hyperkontraktur handelt es sich um das zelluläre Korrelat des akuten myokardialen Reperfusionsschadens, der in der Akutphase der Reperfusion den wichtigsten Mechanismus der Myokardschädigung darstellt. Er entsteht durch das gleichzeitige Auftreten von hohen Kalziumspiegeln und einer Reenergetisierung der Myokardzellen über eine überschüssige Aktivierung des Kontraktionsapparates.

Diese Studie demonstriert, dass es tatsächlich zu einer p38 MAPK-Aktivierung unter simulierter Ischämie kommt, die in den ersten 5 min der Reperfusionsphase noch weiter zunimmt. Durch eine Hemmung dieser p38 MAPK-Aktivität in der frühen Reperfusionsphase konnte das Ausmaß der Hyperkontraktur der Kardiomyozyten stark vermindert werden.

Es stellt sich nun die Frage, auf welchem zellulären Mechanismus diese Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden beruht.

1. Es könnte eine beschleunigte  $\text{Ca}^{2+}$ -Elimination aus dem Zytosol vorliegen. Abdallah et al. (2005) haben festgestellt, dass eine Beschleunigung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Elimination über das Sarkolemm gegen den akuten myokardialen Reperfusionsschaden bzw. die Hyperkontraktur schützt. Die hier vorgestellten Ergebnisse zur zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Erholung (Abb.4.3.2.1) zeigen, dass es zu keiner schnelleren  $\text{Ca}^{2+}$ -Elimination in der Reperfusionsphase kam, wenn die p38 MAPK gehemmt wurde. Eine Verminderung der Hyperkontraktur durch eine beschleunigte  $\text{Ca}^{2+}$ -Elimination wurde somit ausgeschlossen.

2. Die protektive Wirkung einer p38 MAPK-Hemmung könnte durch eine Abnahme der Oszillationsfrequenz hervorgerufen werden. Nach dem ersten initialen

Ca<sup>2+</sup>-Abfall unter simulierter Reperfusion treten Ca<sup>2+</sup>-Oszillationen auf, die durch eine zyklische Verschiebung von Ca<sup>2+</sup> zwischen Sarkoplasmatischem Retikulum (SR) und Zytosol hervorgerufen werden (Sigmund et al., 1992; Piper et al., 1993). Durch die unter den Ca<sup>2+</sup>-Oszillationen auftretenden, zeitweise sehr hohen Kalziumkonzentrationen und der gleichzeitig wiederkehrenden zellulären Reenergetisierung kommt es über eine überschießende Kontraktion der Myofibrillen zur Hyperkontraktur, d.h. einer Zelllängenabnahme auf ca. 30 % der Initiallänge (Ladilov et al., 1999; Siegmund et al., 1990). Die Oszillationen von zytosolischem Ca<sup>2+</sup> finden zeitgleich mit der Hyperkontraktorentwicklung statt. Durch Unterdrückung der Oszillationen kann die Hyperkontraktur der Kardiomyozyten verhindert werden (Sigmund et al., 1997). Unter Hemmung der p38 MAPK in der Reperfusionsphase waren die Oszillationen, die unter Kontrollbedingungen bei 4 min ihr Maximum haben, aufgehoben. Dies weist darauf hin, dass die p38 MAPK-Hemmung gegen die Hyperkontraktur schützt, weil hierdurch die Ca<sup>2+</sup>-Oszillationen unterdrückt werden.

Für die Reduktion der Ca<sup>2+</sup>-Oszillationen sind mehrere mechanistische Erklärungen denkbar.

1. Möglich wäre eine Modifikation der Ca<sup>2+</sup>-freisetzenden (Ryanodinrezeptor) oder der Ca<sup>2+</sup>-aufnehmenden Mechanismen (Ca<sup>2+</sup>-ATPase) des SR über eine Beeinflussung der Aktivität der zytosomatischen Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). P38 MAPK-Aktivierung führt über Aktivierung von Phospholipase A<sub>2</sub> zur Freisetzung von freien Fettsäuren u. a. Arachidonsäure, was eine Verstärkung des Ca<sup>2+</sup>-Cyclings zwischen SR und Zytotoplasma bewirken kann (Lawrence et al., 2003). Inhibition der p38 MAPK senkt über Hemmung dieses Aktivierungsweges das Ca<sup>2+</sup>-Cycling zwischen SR und Zytoplasma (Magne et al., 2001).

2. Denkbar ist auch eine Hemmung des Ryanodinrezeptors, bei dessen Hemmung die Oszillationen ausbleiben (Sigmund et al., 1997), zumal gezeigt werden konnte, dass Arachidonsäure in Herzmuskelzellen zu gesteigerter Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung über den Ryanodinrezeptor führt (Damron et al., 1993; Dettbarn et al., 1993; El-Hayek et al., 1993). Eine Hemmung des oben beschriebenen Aktivierungsweges (p38 MAPK > PLA<sub>2</sub>) könnte also eine Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung über den Ryanodinrezeptor, und somit die Oszillationen, reduzieren.

Für diese Hypothesen spricht auch, dass in vivo protektive Effekte auf Herzinfarktgröße durch Behandlung mit PLA<sub>2</sub>-Inhibitoren festgestellt wurden

(Lawrence et al., 2003). Um einen genauen mechanistischen Ansatz zu identifizieren sind jedoch noch weitere Studien nötig.

**3.** Der protektive Effekt durch Hemmung der p38 MAPK könnte auch durch eine verzögerte pH-Erholung in der Reperfusion hervorgerufen werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine verzögerte pH-Erholung in Phase 2 der  $\text{Ca}^{2+}$ -Erholung die Kalziumoszillationen und die Hyperkontraktur signifikant reduziert (Schäfer et al., 2000; Ladilov et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit ist jedoch gezeigt, dass in der Reperfusion kein Unterschied bezüglich des pH-Wertes gegenüber Kontrolle unter dem Einfluss einer p38 MAPK-Hemmung auftritt.

Es stellt sich die Frage, wodurch die p38 MAPK in Ischämie/Reperfusion aktiviert wird. Man weiß, dass die p38 MAPK durch ROS (reactive oxygen species) aktiviert wird (Clerk et al., 1998; Andre Kulisz et al., 2002) und ROS in Hypoxie (Duranteau et al., 1998) und noch in größerem Ausmaß in der Reoxygenation gebildet werden (Terry et al., 1997). Auch konnte demonstriert werden, dass die Aktivierung der p38 MAPK durch den Einsatz von Radikalfängern, sowohl in Hypoxie, als auch in Reoxygenation unterdrückt werden kann (Clerk et al., 1998; Andre Kulisz et al., 2002). Auch im experimentellen Modell dieser Arbeit wurde untersucht, ob die p38 MAPK-Phosphorylierung durch Hemmung von ROS supprimiert werden kann, und ob diese Hemmung einen protektiven Einfluss auf den frühen myokardialen Reperfusionsschaden hat. Es zeigte sich, dass die p38 MAPK-Aktivierung in der frühen Reperusionsphase durch den Radikalfänger N-Acetylcystein inhibiert wird. Es wurde auch gefunden, dass bei Gabe von N-Acetylcystein die reoxygenationsinduzierten Oszillationen des zytosolischen Kalziums signifikant gesenkt sind. Auch die Hyperkontraktur war in Gegenwart von N-Acetylcystein deutlich vermindert. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass ROS ein Upstream-Signal der p38 MAPK in der reoxygenierten Myokardzelle darstellen und daher als Trigger für die durch p38 MAPK induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen in der Reperusionsphase fungieren.

Die gefundenen Ergebnisse könnten Befunde aus verschiedenen früheren Studien an intakten Herzen erklären, die gezeigt haben, dass eine Hemmung der p38 MAPK

in Ischämie und Reperfusion (Barancik et al.2000), oder auch nur in Reperfusion (Xin L. Ma et al., 1999) die Nekroseareale verkleinert.

Auch durch Hemmung von ROS in Ischämie konnten kardioprotektive Effekte an in-vivo-Modellen gezeigt werden, z.B. mit SOD (Superoxide dismutase) (Werns et al., 1985), mit SOD kombiniert mit Katalase (Jolly et al., 1984), mit MPG (2-Mercaptopropionylglycine) + 1,10 Phenantrolin (Terry et al., 1997) oder mit N-Acetylcystein (Fischer et al., 2003; Alberola et al., 1991), in anderen, dass Radikalfänger sogar nur in der Reperfusion eingesetzt zu einem Schutz der Zelle führen (Jolly et al., 1984, Ambrosio et al., 1987). Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit am zellulären Modell von Ischämie-Reperfusion kann vermutet werden, dass ein Teil des protektiven Effektes einer antioxidativen Therapie des ischämisch-reperfundierten Herzens auf Unterdrückung des ROS-p38 MAPK-Signalweges beruht.

Es muss aber auch angemerkt werden, dass in einigen Studien kein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe bei Gabe von SOD in der Ischämie und Reperfusionsphase (Uraizee et al., 1987) oder nur in der Reperfusionsphase (Gallagher et al., 1986; Przyklenk et al., 1989) festgestellt wurde. Für diese Diskrepanz sind verschiedene Gründe denkbar. Zum einen ist die Hemmung von Radikalbildung bei unterschiedlichen antioxidativen Interventionen intrazellulär sehr unterschiedlich. Zum anderen sind auch Bedingungen denkbar, bei denen der zuvor beschriebene Mechanismus einen geringen Einfluss hat. Über diesen Mechanismus werden, wie oben diskutiert, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen in einer  $\text{Ca}^{2+}$ -überladenen Herzzelle moduliert. Bei sehr hohen zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegeln treten aber vermutlich starke  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen auch ohne den modulierenden Einfluss von ROS und p38 MAPK auf.

## **5.2 Schlussfolgerung**

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass eine Hemmung der p38 MAPK in der Reperfusionsphase den myokardialen Reperfusionsschaden zu unterdrücken vermag. Dies lässt die Hemmung der p38 MAPK als Therapie zur Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden vielversprechend erscheinen.

## 6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Hauptbefunde unserer Studie zeigen, dass

- 1) die p38 MAPK-Aktivierung unter Ischämie- und Reperusionsbedingungen in Herzmuskelzellen stattfindet.
- 2) Hemmung der p38 MAPK die Hyperkontraktur in der frühen Reperusionsphase signifikant reduziert.
- 3) die Abnahme der Hyperkontraktur in der Reperfusion bei p38 MAPK-Hemmung auf eine Veränderung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase, speziell der Unterdrückung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen, zurückzuführen ist.
- 4) ROS in der frühen Reperusionsphase ein Upstream-Signal der p38 MAPK darstellen.

## 7 Summary

Our principal findings show, that

- 1) ischemia and reperfusion cause activation of p38 MAPK in cardiomyocytes.
- 2) inhibition of p38 MAPK reduces reperfusion-induced hypercontracture in the first few minutes of reperfusion.
- 3) reduction of hypercontracture in reperfusion is caused by alteration of  $\text{Ca}^{2+}$ -homeostasis, specifically by depression of  $\text{Ca}^{2+}$ -oscillations.
- 4) reactive oxygen species are an upstream-Signal of p38 MAPK in the first few minutes of reperfusion.

## 8 Literatur

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

Alberola A, Such L, Gil F, Zaragoza R, Morcillo EJ. Protective effect of N-acetylcysteine on ischaemia-induced myocardial damage in canine heart. *Naunyn Schmiedebergs. Arch Pharmacol* 1991; 343: 505-10.

Allshire A, Piper HM, Cuthbertson KS, Cobbold PH. Cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in single rat heart cells during anoxia and reoxygenation. *Biochem J* 1987; 244: 381-5.

Ambrosio G, Weisfeldt ML, Jacobus WE, Flaherty JT. Evidence for a reversible oxygen radical-mediated component of reperfusion injury: reduction by recombinant human superoxide dismutase administered at the time of reflow. *Circulation*. 1987; 75: 282-91.

Anu Punj, James W. Mockridge, Saleha Farooqui, Michael S. Marber and Richard J. Heads. Sustained activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase during recovery from simulated ischaemia mediates adaptive cytoprotection in cardiomyocytes. *Biochem. J.* 2000; 350: 891-899.

Barancik, Miroslav; Htun, Patrik; Strohm, Claudia; Kilian, Sven; Schaper, Wolfgang. Inhibition of the Cardiac p38-MAPKinase Pathway by SB 203580 Delays Ischemic Cell Death. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2000; 35: 474-483.

Barrabes JA, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Piper HM, Solares J, Gonzalez MA, Oliveras J, Herrejon MP, Soler Soler J. Myocardial segment shrinkage during coronary reperfusion in situ. Relation to hypercontracture and myocardial necrosis. *Pflugers Arch.* 1996; 431: 519-26.



Bogoyevitch MA, Gillespie-Brown J, Kettermann AJ, Fuller SJ, Ben-Levy R, Ashworth A, Marshall CJ, Sugden PH. Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ Res.* 1996; 79: 162-73.

Budinger GR, Duranteau J, Chandel NS, Schumacker PT. Hibernation during hypoxia in cardiomyocytes. Role of mitochondria as the O<sub>2</sub> sensor. *J Biol Chem.* 1998; 273: 3320-6.

Clerk A, Fuller SJ, Michael A, Sugden PH. Stimulation of "stress-regulated" mitogen-activated protein kinases (stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases) in perfused rat hearts by oxidative and other stresses. *J Biol Chem.* 1998; 273: 7228-34.

Damron, D. S. and Bond, M.: Modulation of Ca<sup>2+</sup> cycling in cardiac myocytes by arachidonic acid. *Circ. Res.* 1993; 72: 376-386.

Dettbarn, C. A. and Palade, P.: Arachidonic acid-induced Ca<sup>2+</sup> release from isolated sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Pharmacol.* 1993; 45: 1301-1309.

Duranteau, J, Cahndel NS, Kulisz A, Shao Z, and Schumacker PT. Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 1998; 273: 11619-11624.

El-Hayek, R., Valdivia, C., Valdivia, H. H., Hogan, K. and Coronado, R.: Activation of the Ca<sup>2+</sup> release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by palmitoyl carnitine. *Biophys. J.* 1993; 65: 779-789.

Uwe M. Fischer, Charles S. Cox jr, Steven J. Allen, Randolph H. Stewart, Uwe Mehlhorn, Glen A. Laine. The antioxidant N-acetylcysteine preserves myocardial function and dininishes oxidative stress ater cardioplegic arrest.

*The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2003; 126 number 5

Fujiwara H, Onodera T, Tanaka M, Miyazaki S, Wu DJ, Matsuda M, Kawamura A, Ishida M, Takemura G, Fujiwara Y, et al.. Acceleration of cell necrosis following reperfusion after ischemia in the pig heart without collateral circulation. *Am J Cardiol.* 1989; 7;63(10): 14E-18E.

Gallagher KP, Buda AJ, Pace D, Gerren RA, Schlafer M. Failure of superoxide dismutase and catalase to alter size of infarction in conscious dogs after 3 hours of occlusion followed by reperfusion. *Circulation.* 1986; 73: 1065-76.

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

Gottlieb RA, Burlison KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest.* 1994; 94: 1621-8.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985; 260: 3440-50.

Haigney MC, Miyata H, Lakatta EG, Stern MD, Silverman HS. Dependence of hypoxic cellular calcium loading on Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange. *Circ Res.* 1992; 71: 547-57.

Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB, Abrams GD, Lucchesi BR. Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ Res.* 1984; 54: 277-85.

Koop A, Piper HM. Protection of energy status of hypoxic cardiomyocytes by mild acidosis. *J.Mol Cell Cardiol;* 24: 55-65.

Andre Kulisz, Ningfang Chen, Navdeep S. Chandel, Zuohui Shao, and Paul T. Schumacker. Mitochondrial ROS initiate phosphorylation of p38 MAP kinase during hypoxia in cardiomyocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282: 1324-1389.

Kupriyanov VV, Xiang B, Butler KW, St-Jean M, Deslauriers R. Energy metabolism, intracellular Na<sup>+</sup> and contractile function in isolated pig and rat hearts during cardioplegic ischemia and reperfusion: <sup>23</sup>Na- and <sup>31</sup>P-NMR studies. *Basic Res Cardiol*. 1995; 90: 220-33.

Kyhse-Andersen J. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose *J. Biochem Biophys Methods*. 1984; 10: 203-9.

Ladilov Y, Haffner S, Balsler-Schafer C, Maxeiner H, Piper HM. Cardioprotective effects of KB-R7943: a novel inhibitor of the reverse mode of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Am J Physiol*. 1999; 276: 1868-76.

Ladilov Y, Siegmund B, Piper HM. Protection of reoxygenated cardiomyocytes against hypercontracture by inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *Am J Physiol*. 1995; 268: 1531-9.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-5.

Lawrence KM, Scarabelli TM, Turtle L, Chanalaris A, Townsend PA, Carroll CJ, Hubank M, Stephanou A, Knight RA, Latchman DS. Urocortin protects cardiac myocytes from ischemia/reperfusion injury by attenuating calcium-insensitive phospholipase A2 gene expression. *FASEB J*. 2003; 17: 2313-5.

Leppa S, Saffrich R, Ansorge W, Bohmann D. Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC 12 cell differentiation. *EMBO J*. 1998; 17: 4404-13.

Leysens A, Nowicky AV, Patterson L, Crompton M, Duchen MR.

The relationship between mitochondrial state, ATP hydrolysis,  $[Mg^{2+}]_i$  and  $[Ca^{2+}]_i$  studied in isolated rat cardiomyocytes. *J Physiol.* 1996; 496: 111-28.

Li Q, Altschuld RA, Stokes BT. Quantitation of intracellular free calcium in single adult cardiomyocytes by fura-2 fluorescence microscopy: calibration of fura-2 ratios. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987; 147: 120-6.

Sandrine Magne, Dominique Couchie, Françoise Pecker, and Catherine Pavoine  
 $\beta_2$ -Adrenergic Receptor Agonists Increase Intracellular Free  $Ca^{2+}$  Concentration Cycling in Ventricular Cardiomyocytes through p38 and p42/44 MAPK-mediated Cytosolic Phospholipase  $A_2$  Activation. *Biological Chemistry Vol. 276, No.43, Issue of October 26, pp.35539-39548.*

Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, Vande Woude GF, Ahn NG. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science*, 1994; 265 (5174): 966-970.

Owens LM, Fralix TA, Murphy E, Cascio WE, Gettes LS. Correlation of ischemia-induced extracellular and intracellular ion changes to cell-to-cell electrical uncoupling in isolated blood-perfused rabbit hearts. *Circulation.* 1996; 94(1):10-3.

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

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

Piper HM, Abdallah Y, Schafer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 2004; 61(3): 365-71.

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

Piper HM, Siegmund B, Ladilov YuV, Schluter KD. Calcium and sodium control in hypoxic-reoxygenated cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol.* 1993; 88(5): 471-82.

Przyklenk K, Kloner RA. "Reperfusion injury" by oxygen-derived free radicals? Effect of superoxide dismutase plus catalase, given at the time of reperfusion, on myocardial infarct size, contractile function, coronary microvasculature, and regional myocardial blood flow. *Circ Res.* 1989; 64(1): 86-96.

Schäfer C., Y.V. Ladilov, B. Siegmund and H. M. Piper. Importance of bicarbonate transport for protection of cardiomyocytes against reoxygenation injury. *Am J Physiol.* 2000; 278: 1457-1463.

Siegmund B, Kliez T, Schwartz P, Piper HM. Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxic-reoxygenated cardiomyocytes. *Am J Physiol.* 1991; 260: 426-35.

Siegmund B, Koop A, Kliez T, Schwartz P, Piper HM. Sarcolemmal integrity and metabolic competence of cardiomyocytes under anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol.* 1990; 258: 285-91.

Siegmund B, Ladilov YV, Piper HM. Importance of sodium for recovery of calcium control in reoxygenated cardiomyocytes. *Am J Physiol.* 1994; 267: 506-13.

Siegmund B, Schlack W, Ladilov YV, Balsler C, Piper HM. Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture. *Circulation.* 1997; 16;96(12): 4372-9.

Siegmund B, Zude R, Piper HM. Recovery of anoxic-reoxygenated cardiomyocytes from severe Ca<sup>2+</sup> overload. *Am J Physiol.* 1992; 263: 1262-9.

Terry L. Vanden Hoek, Changqing Li, Zuohui Shao, Paul T. Schumacker and Lance B. Becker. Significant Levels of Oxidants are Generated by Isolated Cardiomyocytes During Ischemia Prior to Reperfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1997; 29: 2571-2583.

Tian-Li Yue, Chuanlin Wang, Juan-Li Gu, Xin-Ling Ma, Sanjay Kumar, John C. Lee, Giora Z. Feuerstein, Heath Thomas, Beverly Maleeff, Eiot H. Ohlstein. Inhibition of Extracellular Signal-Regulated Kinase Enhances Ischemia/ Reoxygenation- Induced Apoptosis in Cultured Cardiac Myocytes and Exaggerates Reperfusion Injury in Isolated Perfused Heart. *Circ. Res.* 2000; 86: 692-699.

Umansky SR, Cuenco GM, Khutzian SS, Barr PJ, Tomei LD. Post- ischemic apoptotic death of rat neonatal cardiomyocytes. *Cell Death Differ* 1995; 2: 235-241.

Uraizee A, Reimer KA, Murry CE, Jennings RB. Failure of superoxide dismutase to limit size of myocardial infarction after 40 minutes of ischemia and 4 days of reperfusion in dogs. *Circulation.* 1987; 75(6): 1237-48.

Vanden Hoek TL, Li C, Shao Z, Schumacker PT, Becker LB. Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 1997; 29(9): 2571-83.

Werns SW, Shea MJ, Driscoll EM, Cohen C, Abrams GD, Pitt B, Lucchesi BR. The independent effects of oxygen radical scavengers on canine infarct size. Reduction by superoxide dismutase but not catalase. *Circ Res.* 1985; 56(6): 895-8.

Xin L. Ma, MD, PhD; Sanjay Kumar, PhD; Feng Gao, PhD; Calvert S. Loudon, PhD; Bernard L. Lopez, MD; Theodore A. Christopher, MD; Chuanlin Wang, MD; John C. Lee, PhD; Giora Z. Feuerstein, MD; Tian- Li Yue, PhD. Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Decreases Cardiomyocytes Apoptosis and Improves Cardiac Funktion After Myocardial Ischemia and Reperfusion. *Circulation.* 1999; 99: 1685-1691.

Yoshinori Seko, Naoyuki Takahashi, Kazuyuki Tobe, Takashi Kadowaki, and Yoshio Yazaki. Hypoxia and Hypoxia/ Reoxygenation Activate p 65PAK, p38Mitogen-Activated Protein Kinase( MAPK), and Stress-Activated Protein Kinase( SAPK) in Cultured Rat Cardiac Myocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997; 239: 840-844.

## 9 Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

(Henning Pieper)



## 10 Danksagung

Herrn Professor Dr. Dr. H. M. Piper danke ich für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes innerhalb des Physiologischen Institutes, für die gute Betreuung und die hilfreiche Kritik, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. Y. Abdallah danke ich für die intensive Unterstützung und die nette Betreuung dieser Arbeit und für seine wertvollen Anregungen.

Für die hervorragende technische Unterstützung möchte ich mich bei Frau Daniela Schreiber bedanken.

Für das nette Arbeitsklima danke ich allen anderen Mitgliedern des Institutes und besonders des Calciumlabors.

Recht herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Saskia Peters für die guten Ratschläge bedanken.

Vielen Dank an meine Eltern, die mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben.

Einen besonderen Dank an meine Freundin Katrin.

Kiel den 15.08.2008