Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin B (Direktor Univ.- Prof. Dr. med. Stephan Felix) der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

# Die Rolle von GSK-3β bei der rezeptorvermittelten Signaltransduktion am Beispiel des Adenosinrezeptoragonisten NECA unter besonderer Betrachtung von Src und PI3K

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

2013

vorgelegt von Heike K. Richter geboren am 22. 11.1983 in Mainz

Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reiner Biffar
1. Gutachter:	Prof. Dr. med. S. Felix
2. Gutachter:	Prof. Dr. med. S. Blankenberg
Ort, Raum:	Institut für Pharmakologie, Felix-Hausdorff-Str. 3, 17475 Greifswald, Seminarraum 1/2

Tag der Disputation: 08.09.2014

# Inhaltsverzeichnis

Ab	kürzu	ingsverz	zeichnisI
1	Einl	eitung	1 -
	1.1	Ischän	nie-/Reperfusionsschaden 2 -
	1.2	Myoka	urdprotektion durch Präkonditionierung 3 -
	1.3	Myoka	rdprotektion durch Postkonditionierung 7 -
	1.4	Charal	sterisierung der untersuchten Signalelemente und Vorarbeiten
		unsere	r Arbeitsgruppe 8 -
		1.4.1	Glycogensynthasekinase-3β8-
		1.4.2	Adenosinrezeptoren 10 -
		1.4.3	Src und PI3K-Akt-Signalweg 10 -
	1.5	Aufgal	benstellung 12 -
2	Mat	erial un	d Methoden 13 -
	2.1	Materi	alien 13 -
		2.1.1	Chemikalien und Reagenzien 13 -
		2.1.2	Medien, Puffer und Lösungen 15 -
		2.1.3	Substanzen 16 -
		2.1.4	Antikörper 17 -
		2.1.5	Tiere und Zelllinien 17 -
		2.1.6	Hilfsmittel und Geräte 17 -
2.2 Methoden		den 18 -	
		2.2.1	Isolation und Kultivierung adulter ventrikulärer
			Rattenkardiomyozyten 18 -
		2.2.2	Adenovirale Transfektion adulter Kardiomyozyten mit
			Varianten von GSK-3β 20 -
		2.2.3	Endwertbestimmung des mitochondrialen Membranpotentials
			am Durchflußzytometer 24 -
		2.2.4	Statistik 29 -
3	Erge	ebnisse.	30 -
	3.1	Beeinf	lussung der Aktivität von GSK-3β durch pharmakologische
		Enzym	inhibition 32 -

		3.1.1	Untersuchung der Signaltransduktion zwischen		
			Adenosinrezeptor und mPTP unter Betrachtung von GSK-3β,		
			PI3K und Src 36 -		
		3.1.2	Untersuchung der GSK-3\beta-vermittelten Signaltransduktion		
			unter Betrachtung von PI3K und Src 38 -		
	3.2	Beeinf	lussung der Aktivität von GSK-3β mittels adenoviraler		
		Transfe	ektion mit genetischen Varianten von GSK-3β 40 -		
		3.2.1	Überprüfung der Expression der transfizierten GSK-3β-		
			Varianten mittels Western Blot-Analyse 41 -		
		3.2.2	Untersuchung wt-GSK-3β-transfizierter Kardiomyozyten unter		
			Peroxidstress 43 -		
		3.2.3	Untersuchung dn-GSK-3β-transfizierter Kardiomyozyten unter		
			Peroxidstress 44 -		
		3.2.4	Untersuchung ca-GSK-3β-transfizierter Kardiomyozyten unter		
			Peroxidstress 46 -		
4	Disk	ussion	48 -		
	4.1	In vitro	-Zellmodell adulter Rattenkardiomyozyten 50 -		
	4.2	Die Ro	lle von GSK-3β während der Reperfusion 51 -		
	4.3	Die a	denosinrezeptorvermittelte Signaltransduktion während der		
		Reperf	usion 53 -		
	4.4	Beeinf	lussung von GSK-3β durch adenovirale Transfektion mit		
		genetis	etisch veränderten Varianten von GSK-3β 58 -		
	4.5	Ausbli	- 61 -		
5	Zusa	ammenf	assung 63 -		
6	Lite	raturvei	rzeichnis - 65 -		
-	Litte	i utur ver			
7	Anh	ang	- 77 -		
	7.1	Beeinf	lussung der Aktivität von GSK-3 $\beta$ durch pharmakologische		
		Enzym	inhibition 77 -		
	7.2	Beeinf	lussung der Aktivität von GSK-3β mittels adenoviraler		
		Transfe	ektion mit genetischen Varianten von GSK-3β 79 -		

# Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Ala	Alanin
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchonininsäure
ca-GSK-3β	konstitutiv aktive GSK-3 $\beta$ , <i>constitutive active GSK-3<math>\beta</math></i>
cDNA	komplementäre DNA, complementary DNA
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure, desoxyribonucleic acid
Cu	Kupfer
dn-GSK-3β	dominant negative GSK-3 $\beta$ , <i>dominant negative GSK-3<math>\beta</math></i>
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor, epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthetase
ERK	extracellular-signal regulated kinase
FACS	Durchflusszytometer, fluorescence activated cell sorting
GC	Guanylatzyklase, guanylat cyclase
GSK-3β	Glykogensynthasekinase-3β
$H_2O_2$	Wasserstoffperoxid
HB-EGF	Heparin binding-EGF-like growth factor
HEK293	human embryonic kidney 293
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IPC	ischämische Präkonditionierung, ischemic preconditioning
IPost	ischämische Postkonditionierung, ischemic postconditioning
Da	Dalton
K <sub>i</sub>	Dissoziationskonstante
LiCl	Lithiumchlorid, GSK-3β-Inhibitor
Lys	Lysin
МАРКК	MAP-Kinase-Kinase, mitogen activated protein kinase kinase
Mek	mitogen activated Erk activating kinase

mK <sub>ATP</sub>	mitochondrialer ATP-abhängiger Kaliumkanal
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mPTP	mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore, mitochondrial
	permeability transition pore
mRNA	Boten-RNA, messenger RNA
NECA	5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine, A1/A2-Adenosinrezeptoragonist
NO	Stickstoffmonoxid, nitric oxide
ns	nicht signifikant
PCR	Polymerasekettenreaktion, polymerase chain reaction
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinsositol-3-Phosphat
РКВ	Proteinkinase B, Akt
РКС	Proteinkinase C
PP2	4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine,
	Src-Inhibitor
PTCA	Perkutane transluminale koronare Ballonagioplastie, percutaneous
	transluminal coronary angioplasty
rpm	Umdrehungen pro Minute, rounds per minute
RISK	Reperfusion Injury Salvage Kinase
ROS	reaktive Sauerstoffspezies, reactive oxygen species
SB21	SB216763, GSK-3β-Inhibitor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes, standard error of the mean
Ser	Serin
TMRE	Tetramethylrhodaminethylester
U	Einheit, <i>unit</i>
UV	ultraviolet
VS.	versus
Wort	Wortmannin
wt-GSK-3β	Wildtyp GSK-3β, <i>wildtype GSK-3β</i>
ΔΨm	mitochondriales Membranpotential

# 1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind für knapp 50 % der Todesfälle in Europa verantwortlich und damit die häufigste Todesursache. Allein die ischämische Herzkrankheit führte in Europa im Jahr 2008 zum Tod von 1,92 Millionen Menschen (139). In Deutschland erleiden jährlich etwa 280.000 Menschen einen akuten Myokardinfarkt (10), 40 % der Patienten überleben dieses Ereignis nicht (29,50). Diese Zahlen verdeutlichen, dass kardiovaskuläre Erkrankungen mit ihrer hohen Inzidenz und Sterblichkeit eine Herausforderung für die moderne Medizin darstellen und ein erheblicher Bedarf an neuen Präventions- und Therapiestrategien besteht.

Der akute Myokardinfarkt ist definiert als ein hypoxischer, das heißt durch unzureichende Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff bedingter, Untergang eines umschriebenen Myokardbezirkes (100). Die Ursache ist meist ein akuter Verschluss im Bereich der Koronarien auf dem Boden einer bestehenden Koronaratherosklerose. Ein atherosklerotischer Plaque besteht aus einem lipid- und makrophagenhaltigem Kern, der lumenseitig von einer fibrösen Kappe bedeckt wird (123). Durch proteolytische und phagozytotische Vorgänge wird die Kappe zunehmend abgebaut (78,109), sodass es unter mechanischer Belastung zur Ruptur der Kappe mit Freisetzung von thrombogenem Material kommen kann (104). Dieses Material verursacht durch Thrombozytenaggregation und -adhäsion sowie Aktivierung der Gerinnungskaskade die Bildung intravasaler Thromben und letztendlich den Verschluss des Gefäßes (36).

Der Gefäßverschluss hat eine akute Minderperfusion des betroffenen Herzgewebes mit Hypoxie und Verarmung an metabolischen Substraten zur Folge. Bereits ab einer Ischämiedauer von 20 Minuten setzt eine irreversible Schädigung ein und es kommt, abhängig von der Dauer der Ischämie und der Lokalisation des Gefäßverschlusses, zum Untergang myokardialer Zellen (25). In Folge des Myokardinfarktes kann es aufgrund von Herzrhythmusstörungen und akinetischen bzw. dyskinetischen myokadialen Arealen zum Funktionsausfall des Myokards mit Risiko eines kardiogenen Schocks kommen. Die genannten Komplikationen führen vor allem in der Prähospitalphase und am ersten Postinfarkttag zu einer hohen Letalität (29,50).

In der Notfallmedizin wird bereits prähospital eine Therapie zur Protektion des Herzens eingeleitet. Es erfolgt die Gabe von Antikoagulantien (Acetylsalizylsäure, Heparin und Clopidogrel), um das Gerinnungssystem zu hemmen. Des Weiteren werden vasodilatativ wirkende Nitrate zur Optimierung der Koronarperfusion und Betablocker Verminderung des Sauerstoffbedarfs, Optimierung der Herzaktion zur und Rhythmuskontrolle verabreicht. Durch nasale Sauerstoffgabe wird zudem die Oxigenierung des Blutes verbessert. Durch diese Maßnahmen konnte die Infarktsterblichkeit in den vergangenen Jahren bereits deutlich gesenkt werden (50). Um den drohenden Verlust von kontraktilem Gewebe zu verhindern bzw. einzudämmen, wird die sogenannte Reperfusionstherapie angewendet. Durch Wiedereröffnung des thrombosierten Gefäßes soll die schnellstmögliche Wiederversorgung (Reperfusion) des Gewebes sichergestellt werden (136). Hierfür stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung: Bei der perkutanen transluminalen koronaren Ballonagioplastie (PTCA, percutaneous transluminal coronary angioplasty) wird ein Ballonkatheter über einen peripheren arteriellen Zugang bis zur Verschlussstelle eingebracht, die Stenose mit dem Katheter passiert und mittels eines Ballons aufgedehnt. Gegebenenfalls kann zusätzlich ein intravasaler Stent, das heißt ein Röhrchen aus Drahtgeflecht eingebracht werden, um das Gefäß offen zu halten. Bei einer Lysetherapie erfolgt durch intravenöse Applikation fibrinolytisch wirkender Pharmaka, wie z.B. Streptokinase oder Alteplase, die Auflösung des Thrombus.

# 1.1 Ischämie-/Reperfusionsschaden

Eine rechtzeitige Reperfusionstherapie stellt die einzige Möglichkeit dar, das ischämische Gewebe zu retten. Sie bedeutet allerdings gleichzeitig eine Gefahr, da es während der Reperfusion zu einer erheblichen Schädigung des Myokards kommen kann. Dieser sogenannte Reperfusionsschaden wird definiert als ein nach der Ischämie aufgetretenes Ereignis, das eindeutig mit der Reperfusion assoziiert ist und eine Schädigung von zuvor vitalem Herzgewebe zur Folge hat. (98,136). Hierbei sind nach der Reperfusion im Versorgungsareal der betroffenen Arterie drei verschiedene Zellpopulationen zu finden: 1. Zellen mit subletaler Schädigung, die Ischämie irreversibel letal geschädigt wurden und 3. Zellen, die bereits während der Ischämie irreversibel letal geschädigt wurden und 3. Zellen, die die Ischämie überlebt haben und erst unter der Reperfusion letal geschädigt wurden (24). Diese letztgenannte Zellpopulation könnte durch geeignete Interventionen während der frühen Reperfusion vor dem Zelltod geschützt werden.

Die Bedingungen, die während einer Reperfusion zum Untergang des kontraktilen Gewebes führen, werden schon während der Ischämie geprägt. Der aus der Mangelversorgung mit molekularem Sauerstoff und metabolischen Substraten resultierende Abfall der intrazellulären Adenosintriphosphat-Konzentration (ATP), verbunden mit einer Umstellung auf einen anaeroben Stoffwechsel, führt zur intrazellulärer Ionenanreicherung von Natrium, Kalzium und einer Azidose. Nachfolgend wird durch osmotische Schwellung und Enzymaktivierung das Sakrolemm vorgeschädigt. Das Einsetzen der Reperfusion wiederum aktiviert Mechanismen, die zur Normalisierung des Zellmetabolismus führen sollen, welche aber auch zur weiteren Schädigung der Kardiomyozyten beitragen können. Die wichtigste Rolle spielen hier die Wiederversorgung der Zelle mit Energie, die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies, die schnelle Normalisierung des pH-Wertes, eine weitere Ca<sup>2+</sup>-Überladung des Zytoplasmas und die damit verbundene erhöhte Osmolarität. Sie haben eine myofibrilläre Hyperkontraktilität und eine weitere sakrolemmale Schädigung zur Folge. Im weiteren Verlauf kommt es zur Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP, mitochondrial permeability transition pore), die als das Element (22, 49).Die mPTP entscheidende angesehen wird ist ein spannungsabhängiger, unselektiver Kanal, der in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Durch Formierung der Pore wird diese durchlässig für gelöste Moleküle bis zu einer Größe von 1,5 kDa, das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta \Psi m$ ) bricht zusammen und es kommt zur Entkopplung der Atmungskette mit nachfolgender ATP-Depletion (20,43), weiterer mitochondrialer Schwellung und Freisetzung proapoptotischer Substanzen wie Cytochrom c (67). Der Tod der Zelle wird somit irreversibel eingeleitet (42,49).

#### 1.2 Myokardprotektion durch Präkonditionierung

Trotz einer deutlichen Senkung der Infarktsterblichkeit infolge verbesserter präventiver und therapeutischer Maßnahmen, ist die Sterblichkeit nach akutem Myokardinfarkt weiterhin sehr hoch. Therapeutika wie Antikoagulantien, Betablocker, ACE-Hemmer, Statine und antiarrhythmische Medikamente helfen zwar die Früh- und Spätkomplikationen des Myokardinfarktes zu reduzieren, sie können das Herz jedoch nicht vor dem Ischämie-/Reperfusionsschaden schützen. Seit längerem ist bekannt, dass Herzen endogene Schutzmechanismen besitzen, die durch eine sogenannte ischämische Präkonditionierung (IPC) aktiviert werden können. Anhand von Tiermodellen wurde nachgewiesen, dass Herzen durch kurze, repetetive Ischämie/Reperfusionssequenzen auf eine nachfolgende länger andauernde Ischämie (Indexischämie) und Reperfusion vorbereitet werden können (siehe Abb. 1.1) Diese Art der Vorbehandlung resultierte in einer deutlichen Senkung der Infarktgröße um 75 % (80).

	Indexischämie	Reperfusion
Kurze Ischäm Reperfusionszy	ie-/ /klen	

Abb. 1.1 Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls zur ischämischen Präkonditionierung von Herzen

Die Signaltransduktion der IPC wird in Trigger- und Mediatorphase unterteilt. Durch die repetitiven, kurzen ischämischen Perioden werden vor der Indexischämie Triggersubstanzen freigesetzt, die das Herz in einen geschützten Zustand versetzen. Da die erhöhte Resistenz des Myokards auch nach Auswaschen der Triggersubstanzen für etwa eine Stunde fortbesteht, nimmt man an, dass es zur Aktivierung eines Speicherelements kommt, welches die Schutzwirkung während der Ischämie aufrecht erhält (25).

Wichtige endogene Trigger der IPC sind Bradykinin (38,125), Adenosin (71) und Opioide (76,108), deren protektive Wirkung durch Bindung an spezifische, membranständige, G-Protein gekoppelte Rezeptoren vermittelt wird.

Darüber hinaus ist auch eine pharmakologische Präkonditionierung durch Applikation bestimmter Substanzen vor der Indexischämie möglich. So führt die Behandlung mit Angiotensin II (72), Endothelin (126), Acetylcholin (135),  $\alpha_1$ -Adrenergika (9) und Insulin (1) sowie den bereits erwähnten Triggern Adenosin (71), Opioiden (108) und Bradykinin (38,125) im Tiermodell zu einer Reduktion der Infarktgröße.

Die Wirkung der Opioide wird über eine Transaktivierung membranständiger Opioidrezeptoren vermittelt. Hierbei werden MMPs (Matrix-Metalloproteinasen) aktiviert, die zur Abspaltung von HB-EGF (*Heparin binding-EGF-like growth factor*) aus membran-assoziierten Pro-HB-EGF führen. HB-EGF bindet an seinen monomeren Rezeptor (EGFR, *epidermal growth factor receptor*), dieser dimerisiert, wird autophosphoryliert (16,99) und bildet mit Src und PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) einen Rezeptorkomplex (25). Die PI3K phosphoryliert Akt (PKB, Proteinkinase B) welche wiederum durch Stimulation der (119),endothelialen Stickstoffmonoxidsynthetase (eNOS) eine erhöhte Stickstoffmonoxidproduktion(NO) (23) bewirkt. Konsekutiv kommt es über Aktivierung der Guanylatzyklase (GC) und den Anstieg der zytosolischen Konzentration von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) (23,87) zur Phosphorylierung der Proteinkinase G (PKG) und damit zur Öffnung mitochondrialer ATP-abhängiger Kaliumkanäle (mK<sub>ATP</sub>) in der inneren Mitochondrienmembran (19,103). Durch den Einstrom von Kalium in die Mitochondrien nimmt der mitochondriale pH-Wert leicht ab und es tritt eine osmotische Schwellung der Mitochondrien auf. In Folge dessen werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen spicies) gebildet (88), die als second messenger fungieren und unter anderem die Proteinkinase C (PKC) aktivieren (65).

Bradykinin führt, nach Bindung an seinen spezifischen Rezeptor, zur Aktivierung der durch die PI3K-vermittelten Signalkaskade (siehe oben) (87). Anders als bei den Opioiden scheint der EGFR hier nicht an der Signaltransduktion beteiligt zu sein (16).

Die Stimulation von A1- bzw. A3-Adenosinrezeptoren durch Adenosin führt unabhängig vom über PI3K und ROS vermittelten Signalwege zur Aktivierung der PKC (17). Es wird vermutet, dass es hier nach Rezeptoraktivierung über direkte Aktivierung von Phospholipase C und/oder D zur Phosphorylierung der PKC kommt (91,102).

Die PKC wird als das Element der Signaltransduktion durch die IPC angesehen, welches das Herz in den präkonditionierten Zustand versetzt und stellt wahrscheinlich das Speicherelement dar, welches diesen Zustand während der Indexischämie aufrecht erhält (48).

Die Vermittlung des Schutzes durch die IPC erfolgt letztendlich über Signalkaskaden in der Mediatorphase während der frühen Reperfusion (25,48). Die Aktivierung von A1und/oder A2b-Rezeptoren während der Reperfusion ist Voraussetzung für die Vermittlung der IPC Wirkung (113). Es wird angenommen, dass es durch Aktivierung der PKC zur Beeinflussung der Adenosinrezeptoren kommt, sodass deren Dichte oder Affinität erhöht und somit die Wirkung des endogenen Adenosins verstärkt wird (69,96). In Folge der Adenosinrezeptoraktivierung kommt es zur Phosphorylierung von protektiven Kinasen wie PI3K/Akt, ERK1/2 (*extracellular-signal regulated kinase*), p70S6-Kinase (47) und der Glykogensynthasekinase-3β (GSK-3β) (47,58). Diese



wirken über die Inhibition der Bildung der mPTP letztendlich kardioprotektiv (siehe Abb. 1.2) (45,58).

Signaltransduktion der IPC: Vor der Ischämie: Die Bindung von Opioiden an ihren Abb. 1.2 membranständigen Rezeptor führt über Aktivierung von MMP zur Phosphorylierung des EGFR, welcher mit PI3K und Src Rezeptorkomplexe bildet. Die PI3K-Aktivierung bewirkt über Transaktivierung von Akt und eNOS eine vermehrte NO Produktion. Infolge der NO-vermittelten Aktivierung von GC und des konsekutiven Anstiegs der cGMP-Konzentration wird über Phosphorylierung von PKG die Öffnung des mKATP induziert. Die vermehrte Produktion von ROS infolge der mKATP-Öffnung vermittelt dann die Phosphorylierung von PKC. Bradykinin stimuliert den beschriebenen PI3K-vermittelten Signalweg ohne Beteiligung des EGFR. Die Aktivierung von Al- und A3-Adenosinrezeptoren bewirkt unabhängig vom PI3K-Akt-Signalweg die Aktivierung von PKC

Während der Reperfusion: Infolge der PKC-Aktivierung kommt es zur Beeinflussung von A1- und A2-Adenosinrezeptoren. Diese werden aktiviert und vermitteln durch Phosphorylierung von PI3K/Akt, ERK 1/2, p70S6-Kinase und GSK-3β die Hemmung der mPTP. (26)

# 1.3 Myokardprotektion durch Postkonditionierung

Trotz des großen protektiven Effektes der Präkonditionierung ist deren klinische Bedeutung eher gering, da Patienten meist erst aufgrund einer Herzinfarktsymptomatik, also nach dem Einsetzten der Ischämie, ärztlich vorstellig werden. 2003 berichteten Zao et al. erstmalig über die ischämische Postkonditionierung (IPost), bei der durch kurze repetitive Ischämien während der frühen Reperfusion eine deutliche Reduktion der Infarktgröße ischämischer Hundeherzen erreicht werden konnte (siehe Abb. 1.3) (138).



Abb. 1.3 Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls zur ischämischen Postkonditionierung von Herzen

Eine Postkonditionierung wird durch die bereits genannten endogenen Mediatoren vermittelt, kann aber auch durch die Gabe pharmakologisch aktiver Substanzen, wie beispielsweise den A1/A2-Adenosinrezeptor spezifischen Agonisten NECA (5'-(*N*-*ethylcarboxamido*)adenosine) (132) und AMP579 (61), hervorgerufen werden. Dahingegen wirkt das bei der Präkonditionierung stark protektive Acetylcholin während einer Postkonditionierung nicht (132).

Für die protektive Wirkung der Postkonditionierung ist eine Aktivierung der Kinasen des RISK-Signalweges (*Reperfusion Injury Salvage Kinase*) notwendig. Hierbei spielen der PI3K-Akt- (95,133) und der MEK1/2-ERK1/2-Signalweg (*mitogen activated Erk activating kinase*) (134) eine wichtige Rolle.

Die Aktivierung der PI3K führt über die Produktion des *second messengers* Phosphatidylinsositol-3-Phosphat (PIP3) zur Phosphorylierung von Akt (4). Akt aktiviert wiederum die p70S6-Kinase und eNOS (122). Die p70S6-Kinase ist auch an der insulin- und isofluranvermittelten Myokardprotektion beteiligt (56,68); ihre genaue Bedeutung bei der Signaltransduktion ist jedoch noch unklar. Die Aktivierung von eNOS führt zur NO-Produktion (122), dessen protektive Wirkung durch Phosphorylierung der GC und der daraus resultierenden Produktion von cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) weitergeleitet zu werden scheint (133). Die Aktivierung der GC ist jedoch auch auf einem von eNOS unabhängigem Wege möglich (93).

Bei der Signaltransduktion des Mek1/2-Erk1/2-Weges kommt es durch Phosphorylierung der MAPKK (*mitogen activated protein kinase kinase*) zur Aktivierung von MEK 1 und MEK 2. Diese phosphorylieren wiederum Erk 1 und Erk 2, was zum Schutz des Myokards führt (21,134).

Weitere wichtige Elemente, die für die Signaltransduktion im Rahmen der Postkonditionierung von Bedeutung sind, sind PKC (94,96), mK<sub>ATP</sub> (134) und GSK-3 $\beta$  (90). Eine entscheidende Rolle spielt, wie bei der Präkonditionierung auch, die Hemmung der Formierung der mPTP (6).

# 1.4 Charakterisierung der untersuchten Signalelemente und Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe

#### 1.4.1 Glycogensynthasekinase-3β

Die GSK-3ß nimmt in der Zelle eine wichtige Position ein, da sie als Regulator zahlreicher Stoffwechselvorgänge wie Transkription, Zellteilung, Apoptose und Adhäsion fungiert (33). Es existieren zwei Isofomen des Enzyms: GSK-3α (51 kDa) und GSK-3β (47 kDa), die innerhalb ihrer katalytischen Zentren ein hohes Maß an Homologie aufweisen, sich aber bezüglich ihrer Substrate und substratspezifischen Regulation unterscheiden. Über die unterschiedliche Bedeutung der GSK-Isoformen ist bisher nur wenig bekannt. Anhand verschiedener Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass die beta-Isoform von GSK an der kardioprotektiven Signaltransduktion während der Reperfusion beteiligt ist (41). In der ruhenden Zelle besteht eine basale Phosphorylierung von GSK-3β an Tyrosin 216, sodass das Enzym als aktivierte Form vorliegt und somit eine dauerhafte, negative Beeinflussung seiner Substrate besteht (31,90). Durch Phosphorylierung an Serin 9 erfolgt eine Inaktivierung des Enzyms (33). Wir und andere konnten zeigen, dass die Inaktivierung des Enzyms während der Reperfusion zur Reduktion der Infarktgröße ischämischer Herzen führt (41,90). So konnten wir durch Behandlung ex vivo perfundierter Herzen mit SB216763 (SB21) eine Reduktion der Infarktgröße von über 50 % erreichen (siehe Abb. 1.4) (31).



Abb. 1.4 Durch unsere Arbeitsgruppe erhobene, unveröffentlichte Daten zeigen die Infarktgrößen einzelner Herzen (Kaninchen) in Prozent vom Risikoareal (Mittelwerte  $\pm$  SEM): Eine pharmakologische Inhibition der GSK-3 $\beta$  (SB216763 [1  $\mu$ M]; p<0,001 vs. Kontrolle; \*) führt zu einer deutlichen Senkung der Infarktgröße. Dieser Schutz zeigt eine Abhängigkeit von der PI3K (Wortmannin [100 nM]; ns vs. Kontrolle) und Src (PP2 ([1  $\mu$ M]; ns vs. Kontrolle). Eine Inhibition von Adenosinrezeptoren (SPT ([100  $\mu$ M]; p<0,001 vs.Kontrolle; \*) hat keinen Einfluss auf die SB216763-vermittelte Myokardprotektion (30).

Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, führt eine ligandenvermittelte Aktivierung verschiedener membranständiger G-Protein gekoppelter Rezeptoren, wie z.B. des Adenosinrezeptors, zur Phosphorylierung von GSK-3β. Auch für zahlreiche Substrate dieser Rezeptoren, wie PI3K/Akt, PKC, p70S6-Kinase, Erk 1/2 sowie verschiedene Wachstumsfaktoren konnte eine Beeinflussung der Aktivität von GSK-3β gezeigt werden (18,41,58,110).

In Folge von Ischämie und Reperfusion kommt es in der frühen Phase der Reperfusion zur Öffnung der mPTP (40), was eine irreversible letale Schädigung der Zelle einleiten kann (49). Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der Porenöffnung, z.B. mittels des Inhibitors Cyclosporin A (31), eine protektive Wirkung hat (39,46). Die Hemmung der mPTP-Formierung kann mittels ischämischer und pharmakologischer Prä- und Postkonditionierung erreicht werden (5,6,55).

GSK-3β gilt daher als zentrales Element der Signalübermittlung während der Reperfusion, da viele protektive Signalwege letztendlich durch Beeinflussung der Aktivität von GSK-3 $\beta$  zur Hemmung der mPTP-Formierung führen (58,79). Die genauen Mechanismen, die zwischen GSK-3 $\beta$  und mPTP vermitteln, sind jedoch noch unklar.

## 1.4.2 Adenosinrezeptoren

Es sind vier Adenosinrezeptorsubtypen bekannt, die untereinander eine hohe Sequenzhomologie zeigen: A1- (Gi/0), A2a- (Gs), A2b- (Gs/q) und A3-Adenosinrezeptoren (Gi/0). Das Purin-Nukleosid Adenosin als Hauptagonist dieser Rezeptoren kommt physiologischerweise intra- und extrazellulär in allen Geweben und Körperflüssigkeiten vor und seine Konzentration kann durch Ischämie und Sauerstoffverarmung auf das 100-fache seines Ursprungswertes ansteigen (101).

Wir und andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass für viele Signalschritte während der Reperfusion die Aktivierung von Adenosinrezeptoren notwendig ist (118,129). So hat die Rezeptoraktivierung mittels eines Adenosinrezeptoragonisten wie NECA eine protektive Wirkung (31,132). Des Weiteren können die Effekte von ischämischer Präund Postkonditionierung durch Behandlung mit einem Adenosinrezeptorantagonisten während der Reperfusion blockiert werden (113).

Da die Aktivierung von Adenosinrezeptoren zu einer Phosphorylierung von GSK-3 $\beta$  an Serin 9 und damit zur Inaktivierung des Enzyms führt, wird eine Beteiligung von GSK-3 $\beta$  an der durch den Adenosinrezeptor vermittelten Signaltransduktion postuliert (89). Bisher unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe stützen diese These. So konnte die protektive Wirkung der GSK-3 $\beta$  Inhibierung nicht durch den unspezifischen Adenosinrezeptorblocker SPT (*8-(p-Sulfophenyl)theophylline hydrate*) blockiert werden (siehe Abb. 1.4). Aufgrund fehlender geeigneter Aktivatoren von GSK-3 $\beta$  konnte dessen Position innerhalb der Signaltransduktion jedoch noch nicht genauer definiert werden.

#### 1.4.3 Src und PI3K-Akt-Signalweg

Src spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellproliferation, -migration, -differenzierung und -überleben (12). Sie gehört zu einer Familie von Thyrosinkinasen, die an der Weiterleitung zahlreicher, durch Rezeptoraktivierung vermittelter Signalkaskaden beteiligt sind und dient als Bindeglied zwischen membranständigem Rezeptor und intrazellulärer Signalkaskade (117). Unter anderem konnte die Beteiligung von Src an der Signaltransduktion membranständiger G-Protein gekoppelter Rezeptoren wie z.B. Opioidrezeptoren (25) und bei der Vermittlung der kardioprotektiven Wirkung von Acetylcholin (66) und Quabain (92) gezeigt werden. Des Weiteren ist bekannt, dass es im Rahmen der Signalweiterleitung zur Bildung von Signalkomplexen mit PI3K kommt (92).

Bei der Familie der PI3-Kinasen handelt es sich um Lipidkinasen, die die Synthese des second messengers PIP3 aus membranständigen Inositolpospholipiden katalysieren. PIP3 ist ein wichtiger intrazellulärer second messenger, der für zahlreiche Signalwege Bedeutung ist. Ein wichtiges Zielenzym stellt die zytosolische von Serin-Threonin-Kinase Akt dar. Durch Komplexbildung von Akt und PIP3 kommt es nach Translokation des Komplexes an die Plasmamembran über Phosphorylierung von Akt (Threonin 308) mittels PDK1 (3-Phosphoinisitide dependent kinase 1) und Autophosphorylierung (Serin 473) des Enzyms zur Aktivierung von Akt (4,115). Das zurück ins Zytosol translozierte Akt mit seinen zahlreichen Substraten ist wiederum für die Regulation von Zellproliferation, -metabolismus und -überleben von Bedeutung (106).

Der PI3K-Akt-Signalweg zählt zu den RISK-Signalwegen, die eine wichtige Rolle beim Schutz vor Ischämie-/Reperfusionsschäden spielen (47). Die protektive Wirkung der Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren bzw. von Rezeptoren zahlreicher Wachstumsfaktoren erfolgt über diesen Signalweg (13,47).

Sowohl Src als auch die PI3K werden in der Signaltransduktion als der GSK-3β vorgeschaltet angesehen (siehe Kap 1.2). Im Rahmen unserer Versuche (bisher unveröffentlichte Ergebnisse) konnte die protektive Wirkung des GSK-3β-Inhibitors SB216763 durch zusätzliche Behandlung mit dem PI3K-Inhibitor Wortmannin (Wort) bzw. dem Src-Inhibitor PP2 (*4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine)* aufgehoben werden (siehe Abb. 1.4). Entgegen der in der Literatur vorherrschenden Meinung weisen diese Ergebnisse auf eine Lokalisierung von PI3K und Src unterhalb von GSK-3β hin.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse unserer Studien auf eine Lokalisation von GSK-3β unterhalb der Adenosinrezeptoren hin. Die Inaktivierung von GSK-3β könnte anschließend über eine Aktivierung von PI3K und Src die Hemmung der mPTP vermitteln und so das Myokard vor dem Ischämie-/Reperfusionsschaden schützen.

# 1.5 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von GSK- $3\beta$  in der rezeptorvermittelten Signaltransduktion während der Reperfusion genauer zu charakterisieren. Diese sollte am Beispiel des Adenosinrezeptoragonisten NECA untersucht werden, wobei insbesondere PI3K und Src betrachtet werden sollten.

Hierzu wurde ein *in vitro*-Zellmodell zur Simulation des oxidativen Stresses während der Reperfusion eingesetzt, bei dem isolierte adulte Rattenkardiomyozyten durch Behandlung mit Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) belastet wurden. Das Monitoring der Zellen erfolgte anhand der Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials  $\Delta \Psi m$ . Hierfür wurden die Zellen mit dem mitochondrienspezifischen, potentialabhängigen Fluoreszenzfarbstoff TMRE (Tetramethylrhodaminethylester) beladenen und mittels Durchflusszytometer (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) analysiert. Hierbei zeigen Veränderungen der mittleren Fluoreszenzintensitäten die Schädigung der Zellen

Mithilfe dieses Zellmodells sollten, die im Rahmen von Vorversuchen an *ex vivo* perfundierten Kaninchenherzen erhobenen Daten (siehe Kapitel 1.4), verifiziert werden. Hierzu sollte zunächst der protektive Effekt einer Rezeptoraktivierung mittels des Adenosinrezeptoragonisten NECA sowie der Inaktivierung von GSK-3 $\beta$  durch SB216763 gezeigt werden. Durch Einsatz von pharmakologischen Inhibitoren von Src und PI3K sollte dann die Stellung dieser beiden Enzyme in der Signaltransduktion genauer untersucht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte eine Modifikation der Aktivität von GSK-3 $\beta$  mittels adenoviraler Transfektion von genetischen GSK-3 $\beta$  Varianten erfolgen. Hierfür standen drei verschiedene Varianten zur Verfügung: Wildtyp, konstitutiv aktive und dominant negative GSK-3 $\beta$ . Diese sollten durch hoch spezifische Beeinflussung der Aktivität von GSK-3 $\beta$  als Werkzeug für spätere Untersuchungen der Bedeutung der GSK-3 $\beta$  in der Signaltransduktion von Prä- bzw. Postkonditionierung dienen.

#### 2 **Material und Methoden**

#### 2.1 **Materialien**

# 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid/bis-Acrylamid (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Amphotericin B	Sigma-Aldrich, D
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, D
Ara C (Cytosine $\beta$ -D-arabinofuranoside)	Sigma-Aldrich, D
BSA (Rinderserumalbumin, bovine serum albumine)	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, D
Cell Lysis Buffer	Cell Signaling, Da
Collagenase Typ CLS II	Cell Systems, Wo

Creatine DMSO (Dimethylsulfoxid) DTT (1,4-Dithiothreit) EDTA (Ethylendiaminotetraessigsäure) Entwickler FCS (fötales Kälberserum, fetal calve serum) Fixierer Glukose Glutamin Glycin H2O2 (Wasserstoffperoxid, 30 %) Heparin-Natrium

# HEPES

(4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid) Roth, Karlsruhe Isopropanol Kaliumchlorid Kaliumdihydrogenphosphat

reisenhofen reisenhofen reisenhofen reisenhofen anvers, USA rthington, Lakewood, USA Sigma-Aldrich, Dreisenhofen Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, Dreisenhofen Tetanal, Norderstedt Invitrogen, Karlsruhe Tetanal, Norderstedt Sigma-Aldrich, Dreisenhofen PAA, Pasching, Österreich Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, Dreisenhofen B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, Dreisenhofen Sigma-Aldrich, Dreisenhofen

Laminin Lämmlipuffer L-Carnitin Milchpulver Magnesiumsulfat Medium DMEM Medium M199 Methanol Natriumchlorid Natriumhydrogencarbonat PBS (phosphate buffered saline) Penicillin/Streptomycin PMSF (Phenylmethylsulforylfluorid) Ponceau S Salzsäure SDS (Sodiumdodecylsulfat) Taurin TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) Thiopental-Natrium (Trapanal) TMRE (Tetramethylrhodaminethylester) Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) Trypsin TTC (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid) Tween 20 BCA Protein Assay Kit Proteinmarker (dual color, prestained) LumiGLO<sup>®</sup> Reagent

Sigma-Aldrich, Dreisenhofen Biorad, Hercules, USA Sigma-Aldrich, Dreisenhofen Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, Dreisenhofen PAA, Pasching, Österreich Invitrogen, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, Dreisenhofen Sigma-Aldrich, Dreisenhofen PAA, Pasching, Österreich Invitrogen, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, Dreisenhofen Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, Dreisenhofen Sigma-Aldrich, Dreisenhofen Biorad, Hercules, USA Altana Pharma, Konstanz Molecular Probes, Göttingen Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich, Dreisenhofen Sigma-Aldrich, Dreisenhofen Roth, Karlsruhe Pierce, Rockford, USA Biorad, Hercules, USA Cell Signaling, Danvers, USA

# 2.1.2 Medien, Puffer und Lösungen

modifiziertes DMEM-Medium	500 ml	DMEM
	50 ml	FCS
	5 ml	Glutamin
	5 ml	Penicillin/Streptomycin
		(10000 U/µg je ml)
modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer	117 mM	Natriumchlorid
	2,6 mM	Kaliumchlorid
	1,2 mM	Magnesiumsulfat
	1,2 mM	Kaliumdihydrogenphosphat
	25 mM	HEPES
	11 mM	Glukose
modifiziertes M199-Medium	500 ml	M199
	0,475 g	Natriumhydrogencarbonat
	5 ml	Penicillin/Streptomycin
		(10000 U/µg je ml)
	0,328 g	Creatine
	0,161 g	L-Carnitine
	0,313 g	Taurin
	500 µl	Ara C (10 mM)
	500 µl	Amphothericin B (0,25 mg/ml)
5 x Tankpuffer	75,5 g	Tris-Base
	470 g	Glycin
	250 ml	SDS (10 %)
	ad 5 1	destilliertes Wasser
TBE-Puffer	90 mM	Tris-HCl
	90 mM	Borsäure
	20 mM	EDTA

10 x TBS	80 g	Natriumchlorid
	2 g	Kaliumchlorid
	30 g	Tris-Base
	ad 1 1	destilliertes Wasser
		рН 7,6
TBST	100 ml	10 x TBS
	1 ml	Tween 20
	ad 1 1	destilliertes Wasser
Thiopental/Heparin	5 ml	Thiopental-Natrium (0,5 g/20 ml)
	10 µl	Heparin-Natrium (5000 I.E./ml)
10 x Transferpuffer	720 g	Glycin
	151,5 g	Tris-Base
	ad 5 1	destilliertes Wasser
1 x Transferpuffer	100 ml	10 x Transferpuffer
	700 ml	destilliertes Wasser

# 2.1.3 Substanzen

SB216763	Biomol, Hamburg
SB415286	Biomol, Hamburg
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen
PP2	Calbiochem/Merck, Darmstadt
Wortmannin	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen
NECA	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen

# 2.1.4 Antikörper

anti-GSK-3β-AK	Cell Signaling, Danvers, USA
anti-phospho-GSK-3β(Ser9)-AK	Cell Signaling, Danvers, USA
goat-anti-rabbit-IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
(horseradish peroxidase linked)	

# 2.1.5 Tiere und Zelllinien

Ratten	Wistar, Charles River, Sulzfeld
HEK 293-Zellen (human embryonic kidney cells)	American Type Culture
	Collection, Rockville, USA

# 2.1.6 Hilfsmittel und Geräte

Röntgenfilm

4-Kammerdeckgläser
6-well-Platten
Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>)
Elektrophoresekammern
Haake DC10-P5 open Bath Circulator
Langendorff-Anlage

Fluoreszenzmikroskop

Durchflusszytometer

Mikrotiterplattenlesegerät

Protran, Schleicher und Schüll, Dassel Amersham HyperfilmTM ECL, GE Healthcare Buckinghamshire, UK Lab-Tek, New York, USA Nunc, Wiesbaden Cellstar®, Greiner, Frickenhausen Biorad, Hercules, USA Thermo Scintific, Waltham, USA Medizinisch-Glastechnische-Werkstätte, Berlin Nikon TE300, Washington DC, USA FACSCalibur<sup>TM</sup>, Becton Dickinson, Heidelberg 1420 Victor2 Multilabel Counter, Wallac, Boston, USA

# 2.2 Methoden

# 2.2.1 Isolation und Kultivierung adulter, ventrikulärer Rattenkardiomyozyten

Für die durchgeführten Versuche wurden adulte, ventrikuläre Rattenkardiomyozyten verwendet. Da diese Zellen nicht teilungsfähig sind, mussten sie immer frisch isoliert werden.

# 2.2.1.1 Isolation adulter Rattenkardiomyozyten

Die Zellisolation wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Staudt (Universität Greifswald, Klinik und Poliklinik Innere Medizin B) wie im Folgenden beschrieben durchgeführt.

Die ventrikulären Kardiomyozyten wurden aus weiblichen Tieren der Rasse Albino-Wistar (180-200 g, 6-8 Wochen) isoliert und an einer modifizierten Langendorff-Anlage perfundiert. Hierfür wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion einer Lösung aus Thiopental und Heparin anästhesiert. Daraufhin wurde der Thorax eröffnet und die Gefäße ober- und unterhalb des noch schlagenden Herzens durchtrennt, sodass Herz und Aorta unverletzt blieben. Nach Entnahme des Herzens und Entfernung der am Präparat verbliebenen thorakalen Organe, wurde das Herz über eine Kanülierung der Aorta an der Langendorff-Anlage befestigt.

Um verbliebene Blutreste zu entfernen und den extrazellulären Kalziumspiegel zu senken wurde das Herz zuerst für drei Minuten mit reinem Perfusionspuffer gespült. Im Anschluss folgte eine 25-minütige Perfusion mit einer kollagenasehaltigen Enzymlösung bei konstantem Druck von 65 mmHg, einer Temperatur von 37 °C unter ständiger Begasung (CO<sub>2</sub> 95 %/O<sub>2</sub> 5 %). Die Enzymlösung bestand aus modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer versetzt mit Kollagenase Typ2 (355 U/ml) und Kalziumchlorid (3,3  $\mu$ M). Nach der Perfusion wurde das Herz auf Ventrikelhöhe von der Anlage getrennt, manuell mithilfe steriler Skalpelle zerkleinert und weitere 10 Minuten in ca. 50 ml der gleichen Enzymlösung dispergiert. Die entstandene Zellsuspension wurde durch ein Netz mit der Maschengröße 200  $\mu$ m filtriert und die Myozyten durch zweimaliges Zentrifugieren der Suspension (1 Minuten, 43 g) und Verwerfen des Überstandes von Zelltrümmern getrennt. Nach Resuspension des Pellets in modifiziertem M199-Medium wurde die extrazelluläre Kalziumkonzentration in zwei

weiteren Zentrifugationsdurchgängen durch Zugabe von Kalziumchlorid-Lösung schrittweise erst auf 200 µM, dann auf 500 µM erhöht.

Zur Zählung der Zellen wurde eine Fuchs-Rosenthal-Kammer verwendet. Intakte Kardiomyozyten zeigen eine längliche glatte Form und eine typische Querstreifung. Die Suspension wurde dann abhängig von der Zelldichte mit modifiziertem M199-Medium auf  $4 \ge 10^4$  Zellen/ml verdünnt.

# 2.2.1.2 Kultivierung adulter Rattenkardiomyozyten

Zur Kultivierung wurden die frisch isolierten, adulten Kardiomyozyten je nach Versuchsaufbau in 4-Kammer-Deckgläsern oder in 6-Well-Platten ausgesät. Pro Vertiefung wurden in den 4-Kammer-Deckgläsern je 1 ml und in den 6-Well-Platten je 2 ml der Myozytensuspension verteilt.

Um eine Adhärenz der Zellen am Boden der Kammern zu gewährleisten, wurden diese zuvor mit Laminin (1 mg/ml) beschichtet. Hierfür wurden die Böden der 4-Kammerdeckgläser jeweils mit einem Gemisch aus 10 µl Laminin und 40 µl PBS benetzt, 6-Well-Platten wurden jeweils mit 20 µl Laminin und 80 µl PBS versetzt. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur und Spülen mit 1 ml PBS wurde die Myozytensuspension eingefüllt. Die anschließende zweistündige Inkubation im Brutschrank stellte eine Anheftung der Zellen sicher. Abgestorbene und nicht abgesetzte Zellen wurden durch einmaliges Waschen mit PBS entfernt und die Kultur wurde dann in modifiziertem M199 begonnen. Bei täglichem Wechsel des Mediums wurden die Myozyten über einen Zeitraum von bis zu drei Tagen kultiviert.



Abb. 2.1: Mittels Phasenkontrastmikroskopie aufgenommene Bilder von kultivierten Kardiomyozten. Die Bilder wurden nach 24 h, 48 h und 72 h angefertigt. Zu allen drei Zeitpunkten zeigen die Zellen eine längliche glatte Form und die für Kardiomyozyten typische Querstreifung.

# 2.2.2 Adenovirale Transfektion adulter Kardiomyozyten mit Varianten von GSK-3β

# 2.2.2.1 Virusherstellung

Die Adenoviren, welche für die durchgeführten Versuche eingesetzt wurden, wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Dr. Mikhail F. Alexeyev (University of Alabama, Mobile, USA) zur Verfügung gestellt. Es wurden drei verschiedene Adenoviren verwendet. Ad. 1782 (wt-GSK-3ß) enthält die Wildtyp-DNA für GSK-3ß, Ad. 1781 (dn-GSK-3B) besitzt eine dominant negative Variante von GSK-3B und Ad. 1808 (ca-GSK-3β) enthält die DNA für eine konstitutiv aktive GSK-3β Variante. Zur Herstellung dieser Adenoviren wurde aus der cDNA von GSK-3ß der kodierende Bereich (IMAGE: 3357620, Open Biosystems, Huntsville, AL, USA) kloniert (Primer GSKfRI: ggaattcgccaccatgtcagggcggcccagaac und GSKrEclXho:cctcgagctagcttt ctcatgatctgg). Bei der Produktion des dn-GSK-3ß wurde durch gerichtete Mutagenese eine Substitution von Lysin an Position 85 gegen Arginin herbeigeführt; zur Herstellung des ca-GSK-3ß wurde ein Aminosäurenaustausch von Serin an Position 9 gegen Alanin durchgeführt. Mittels Sequenzierung wurde die Basenfolge der PCR-Produkte kontrolliert und in den adenoviralen Shuttle-Vektor pMA905 kloniert. Durch Rekombination des Vektors mit dem adenovirus genomic plasmid pBDHfrt in HEK293-Zellen wurden die Adenoviren Ad.1781 (dn-GSK-3β), Ad.1782 (wt-GSK-3β) und Ad.1808 (ca-GSK-3β) hergestellt.

# 2.2.2.2 Reproduktion der Adenoviren

Die Reproduktion der Adenoviren wurde in HEK293-Zellen durchgeführt. Diese wurden in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen ausgesät und mit modifiziertem DMEM-Medium kultiviert. Lagen etwa 60 % Konfluenz der HEK293-Zellen vor, erfolgte die Infektion der Zellen. Hierzu wurden die HEK293-Zellen mit 15 µl Viruslysat in 15 ml DMEM-Medium infiziert und über mehrere Tage kultiviert. Die Zunahme der zellulären Zersetzung, die durch die Virusproduktion hervorgerufen wird, wurde in 24-Stunden-Intervallen mithilfe der Phasenkontrastmikroskopie kontrolliert. Da nach ca. 48 Stunden deutliche zytopathische Effekte beobachtet werden konnten, wurden zu diesem Zeitpunkt die so hergestellten Viren aufgereinigt. Zunächst wurde der Boden der Kulturflasche durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren des Mediums gespült.

Hierdurch wurden Zellreste und Zellen, die das Virus enthalten, abgespült. Die Suspension wurde in ein 50 ml Falcon überführt und bei 2500 rpm 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Medium wurde verworfen und das Pellet in 250 µl sterilem PBS resuspendiert. Durch fünf aufeinander folgende Zyklen aus Einfrieren (Methanol und Trockeneis), Auftauen (37 °C Wasserbad) und 30-sekündigem Vortexen konnten die Zellen aufgeschlossen und das Virus freigesetzt werden. Im Anschluss wurde die Suspension erneut 10 Minuten bei 4 °C mit 2500 rpm zentrifugiert, der virushaltige Überstand in ein Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C gelagert.

## 2.2.2.3 Adenovirale Transfektion und Kultur adulter Rattenkardiomyozyten

Die adulten Rattenkardiomyozyten wurden wie oben beschrieben ausgesät und nach 3-stündiger Inkubationszeit mit virushaltigem M199 infiziert (1:1000). Nach 24 Stunden Inkubation wurde das virushaltige Medium durch virusfreies M199 ersetzt. Während der 72-stündigen Kultivierung der Myozyten fand ein täglicher Wechsel mit virusfreiem M199 statt.

#### 2.2.2.4 Überprüfung der Expression viraler Proteine mittels Western Blot

Um die Expression der adenoviral transfizierten GSK-3β-Varianten zu überprüfen, wurden Myozyten in 6-Well-Platten ausgesät und mit den entsprechenden Adenoviren infiziert. Nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden Inkubation wurden die zytosolischen Proteine isoliert und mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot analysiert.

#### Proteinisolation

Zur Isolation der Proteine wurden die Zellen nach Entfernung des Mediums mit einer Lösung aus jeweils 200  $\mu$ l Lysispuffer/PMSF (1 mM) versetzt. PMSF ist ein Proteinaseinhibitor, der die Lyse der isolierten Proteine durch zelleigene Enzyme verhindern soll. Um die Enzymaktivität möglichst gering zu halten, erfolgte die Isolation der Proteine auf Eis. Mittels Zellschaber wurden die Zellen vom Boden der Kammern gelöst. Nach Überführung der Lysispuffer-Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß wurden die zellulären Proteine durch 15-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C von den übrigen Zellbestandteilen getrennt. 20  $\mu$ l des Überstandes wurden mit 80  $\mu$ l Wasser versetzt und für die Proteinbestimmung verwendet. Weitere 100  $\mu$ l des Überstandes wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 50  $\mu$ l einer Lösung aus Lämmlipuffer und DTT (1 M) (1:10) vermischt. Zur vollständigen Denaturierung der Proteine wurden die Proben für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und dann bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

## Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der BCA-Test verwendet. Der Test beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der Proteine im alkalischen Milieu einen Komplex mit Kupfer bilden. Die Cu<sup>2+</sup>-Ionen werden zu Cu<sup>+</sup>-Ionen reduziert und bilden mit BCA (Bicinchonininsäure) einen farbigen Komplex. Dieser wird photometrisch gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer mitgeführten Verdünnungsreihe bestimmt. 10 µl Probe (siehe Kapitel 2.2.2.4; Proteinisolation) bzw. Standard wurden mit 200 µl Färbereagenz versetzt. Das Färbereagenz enthielt 50 Teile einer 4-%igen Kupfer-II-Sulfat-Lösung und 1 Teil BCA-Lösung. Zur Erstellung einer BSA-Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe einer BSA-Standardlösung (1 mg/ml) in einer Proteinkonzentration von 10, 20, 30, 40 und 50 µg Protein/ml hergestellt. Sowohl Proben als auch Standards wurden in Doppelbestimmung durch Messung der Extinktion bei 562 nm mittels Mikrotiterplatten-Lesegerät analysiert. Die Quantifizierung der Proteine erfolgte anhand der Standard-Verdünnungsreihe.

#### SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Zur Analyse der viralen Proteinexpression wurden die Proteinlösungen durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, mittels Western Blot auf eine Membran übertragen und durch Markierung mit spezifischen Antikörpern detektiert.

Zur Auftrennung der Proteine wurde eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelektrophorese mit 10 %igen SDS-Gelen (Sodiumdodecylsulfat) verwendet. SDS, als anionisches Detergens, führt zur Denaturierung der Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine. Diese Denaturierung wurde durch das beigesetzte DTT, welches zusätzlich zu einer Reduktion der Proteine führt, unterstützt. Es bilden sich negativ geladene Protein-SDS-Komplexe mit einem konstanten Ladungs-Masse-Verhältnis, die im elektrischen Feld zur Anode wandern. Das Polyacrylamidgel wirkt aufgrund seiner porösen Struktur als Molekularsieb und trennt die Proteine somit nach ihrer Größe, d.h. nach ihrem Molekulargewicht, auf. Um eine Aggregation der Proteine während der Elektrophorese zu verhindern und somit schärfere Banden zu erhalten, wurde eine diskontinuierliche Elektrophorese mit einem engporigen Sammel- und einem weitporigen Trenngel (siehe Tab. 2.1) durchgeführt. Die Gele wurden in Gelkassetten mit einem Glasplattenabstand von 1,5 mm hergestellt. Zuerst wurde das 10 %ige Trenngel bis 2 cm unter den Rand der fettfreien Platten gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um eine scharfe Trennlinie zu erhalten. Nach etwa 30 Minuten war das Gel auspolymerisiert, das Isopropanol wurde entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Der Taschenkamm wurde möglichst blasenfrei eingeführt und das Sammelgel polymerisierte in etwa 30 Minuten aus. Die Gelapparatur wurde in eine vertikale Elektrophoresekammer gestellt und die Kammer mit Tankpuffer gefüllt. Nach Entfernen des Taschenkamms wurden die einzelnen Kammern wiederholt mit Tankpuffer gespült. Im Anschluss wurden je 50 µg Protein bzw. 3 µl Marker pro Tasche aufgetragen. Der Marker diente zum Größenvergleich bei der späteren Auswertung der Elektrophorese. Zu Beginn wurde eine Spannung von 80 V angelegt bis die Proteine das Trenngel erreicht hatten. Dann wurde der Lauf bei 100 V fortgesetzt bis die Lauffront den unteren Bereich des Gels erreicht hatte.

	Trenngel (10 %)	Sammelgel
H <sub>2</sub> O	7,9 ml	4,1 ml
Acrylamid/bis-Acrylamid (37,5:1)	6,7 ml	1,0 µl
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	5,0 ml	
1 M Tris-HCl (pH 6,8)		750 µl
SDS (10 %)	200 µl	60 µl
APS (10 %)	200 µl	60 µl
zur Polymerisation zugeben:		
TEMED	8 µl	6 µl

Tab. 2.1: Zusammensetzung der für die SDS-Gelelektrophorese verwendeten Gele

Für den Proteintransfer auf eine Membran wurde der Nassblot nach Towbin et al. durchgeführt (121). Hierbei wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, wo diese aufgrund von hydrophoben Kräften gebunden wurden. Das im Transferpuffer enthaltene Methanol führte zu einer Aktivierung der Bindungsstellen. Als Blotkammer kam eine Elektrophoresekammer von Biorad mit Platin-/Edelstahlelektroden zum Einsatz. Es wurden drei Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran in Tansferpuffer getränkt und die Membran auf das Filterpapier gelegt. Das Gel wurde luftblasenfrei auf die Membran aufgebracht und es wurden weitere drei, in Transferpuffer getränkte, Filterpapiere auf das Gel gelegt. Die Gele wurden eingespannt und in die mit gekühltem Transferpuffer gefüllte Blotkammer eingesetzt. Für den Transfer wurde über 1 ½ Stunden eine Spannung von 100 V angelegt. Um der starken Wärmeentwicklung während des Transfers entgegenzuwirken, wurde gekühlter Transferpuffer verwendet und die Elektrophorese auf Eis durchgeführt. Um die Qualität und Effizienz der Proteinübertragung zu beurteilen, wurde nach dem Blotten eine reversible Ponceau S-Färbung durchgeführt. Der Farbstoff wurde auf die Membran gegeben bis die Banden deutlich sichtbar wurden und überschüssige Farbe durch Spülen mit destilliertem Wasser entfernt. Im Anschluss wurde die Membran durch mehrmaliges Waschen mit TBST wieder entfärbt.

#### Immundetektion

Vor der Detektion der gesuchten Proteine wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran durch 1-stündige Inkubation mit in TBST gelöstem Milchpulver (5 %) gesättigt um unspezifische Reaktionen zwischen Membran und den eingesetzten Antikörpern zu verhindern. Nach mehrfachem Spülen mit TBST erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper (1:1000 in 5 %iger BSA/TBST Lösung) über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Spülen (jeweils 5 Minuten) mit TBST entfernt und die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundäre Antikörper (1:5000 in 5 %iger Milchpulver/TBST-Lösung) inkubiert. Die an den Antikörper gekoppelte Meerettich-Peroxidase bewirkte durch Oxidation von Luminol eine Chemilumineszenz der markierten Proteinbanden. Nach mehrmaligem Waschen und 2-minütiger Inkubation der Membran mit ECL Western Blotting Reagenz LumiGlo wurde in einer Filmkassette ein Film aufgelegt. Nach Entwicklung, Fixierung und Trocknung, konnten die Banden auf dem Film mithilfe des zuvor übertragenen Markers ausgewertet werden.

# 2.2.3 Endwertbestimmung des mitochondrialen Membranpotentials am Durchflußzytometer

In der frühen Phase der Reperfusion kommt es infolge des oxidativen Stresses zur Öffnung der mPTP und damit zum Zusammenbruch des  $\Delta \Psi m$ . Da viele Zellfunktionen

von dessen Stabilität abhängig sind, führt der Zusammenbruch des Potentials letztendlich zum Absterben der Zellen (49). Um den oxidativen Stress während der Reperfusion zu simulieren wurde ein in vitro-Modell isolierter Rattenkardiomyozyten Der oxidative Stress wurde durch Inkubation der Zellen mit etabliert. Wasserstoffperoxid imitiert. Wasserstoffperoxid entwickelt seine schädigende Wirkung nach intrazellulärer Reaktion mit Eisen-II-Ionen zu Superoxidionen (Femton Reaktion) öffnet sich und es kommt durch Depolarisation (53). die mPTP der Mitochondrienmembran zum Zusammenbruch des  $\Delta \Psi m$ . Mittels TMRE, eines mitochondrienspezifischen, potentialabhängigen Fluoreszenzfarbstoffes, konnte das ΔΨm überwacht werden. Eine hohe Fluoreszenzintensität diente als Indikator für ein intaktes  $\Delta \Psi m$ , während ein Fluoreszenzverlust das Zusammenbrechen des  $\Delta \Psi m$  und damit das Einsetzen des Zelltodes anzeigte (2). In Abb. 2.2 ist die Veränderung der TMRE-Fluoreszenzintensität beladener Myozyten unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress mithilfe von fluoreszenzmikroskopischen Bildern dargestellt. Im zeitlichen Verlauf kommt es zur Abnahme der Fluoreszenzintensität. Nach 30 Minuten bricht das  $\Delta \Psi m$  zusammen, was deutlichen Fluoreszenzverlustes erkennen die sich anhand des lässt. Da fluoreszensmikroskopische Messung der Zellen sehr zeitaufwendig ist und nur eine geringe Anzahl von Zellen erfasst werden kann, entschieden wir uns für die Endwertbestimmungen der mittleren Fluoreszenz nach 40 Minuten Peroxidstress am Durchflusszytometer.



 Abb. 2.2: Mikroskopische Aufnahmen des zeitlichen Verlaufs der TMRE-Fluoreszenzintensität in isolierten Kardiomyozyten unter Peroxidstress. Nach 30 Minuten lässt sich ein deutlicher Abfall der Fluoreszenzintensität beobachten, der auf den Zusammenbruch des ΔΨm hinweist.

## 2.2.3.1 Durchflusszytometer

Für die Endwertbestimmung des ΔΨm wurde ein Durchflußzytometer der Firma Becton Dickinson (FACSCalibur<sup>®</sup>, *fluorescence activated cell sorting*) eingesetzt. Dieses ist mit einem Argonlaser der Wellenlänge 488 nm ausgestattet. Die zu messenden Zellen werden einzeln mit hoher Geschwindigkeit durch eine Messküvette gespült und durch Detektion der Ablenkung eines auf sie gerichteten Laserstrahls können Morphologie und Eigenschaften der Zellen beurteilt werden. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, *forward scatter*), welches durch nach vorne abgelenkte Strahlen entsteht, ermöglicht die Bestimmung der absoluten Größe der Zellen. Rechtwinklig abgelenkte Strahlen, sogenanntes Seitwärtsstreulicht (SSC, *side scatter*), geben Auskunft über die Granularität der Zellen. Durch photometrische Messung von Fluorochromen, die durch einen Laser zur Emission von Fluoreszenzlicht bestimmter Wellenlängen angeregt werden können, lassen sich zusätzlich charakteristische Eigenschaften der Zellen erfassen. Die erfassten Daten werden in elektrische Signale umgewandelt und mittels spezifischer Software ausgewertet und dargestellt. Diese Messmethode ermöglicht es, in kurzer Zeit zahlreiche Parameter einer großen Zahl von Zellen zu ermitteln.

# 2.2.3.2 Allgemeiner Versuchsaufbau

Die Zellen wurden, wie zuvor beschrieben, unter sterilen Bedingungen in 4-Kammer-Deckgläsern ausgesät und im Brutschrank bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit und Begasung mit 5 %  $CO_2$  und 95 %  $O_2$  inkubiert. Im gesamten Verlauf des Versuches wurde modifiziertes M199 verwendet.

Das Versuchsprotokoll ist in Abb. 2.3 dargestellt. Nach einem Wechsel des Mediums zu Beginn des Versuches erfolgte eine 5-minütige Inkubation der Zellen im Brutschrank. Bei Behandlung der Zellen mit einem Inhibitor wurde dieser vom ersten Waschschritt an während des gesamten Versuches bei jedem weiteren Mediumwechsel zugesetzt. Im nächsten Schritt wurde das Medium durch TMRE-haltiges Medium (100  $\mu$ M) ersetzt und die Zellen für 20 Minuten inkubiert. Kam NECA als Rezeptoragonist zur Anwendung, wurde dieser dem Medium ab dem 2. Mediumwechsel bei jedem weiteren Wechsel zugegeben. Nach 20 Minuten wurde das farbstoffhaltige Medium verworfen und die Kammern zweimal mit M199 gespült. Es folgte eine 40-minütige Behandlung mit 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in M199. Zur Vorbreitung der Messung am FACS wurden die Myozyten nach 2 Minuten Inkubation mit 100  $\mu$ l Trypsin durch wiederholtes Spülen mit der Pipette vom Boden der Deckgläser gelöst und in ein mit 100 µl M199 befülltes FACS Röhrchen überführt. Nach kurzem Vortexen erfolgte die Messung der TMRE-Fluoreszenz mithilfe des FACS bei 562 nm (FL2-Kanal) und die mittlere Fluoreszenzintensität wurde kalkuliert. Pro Messung wurden 5000 Zellen gescannt, Zelltrümmer mit einer geringen Größe wurden hierbei nicht berücksichtigt.



Abb. 2.3: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls zur Messung des  $\Delta \Psi m$ : Nach einem Mediumwechsel zu Beginn des Versuches (1) folgt eine fünfminütige Inkubation der Zellen. Bei Einsatz eines Antagonisten wird dieser ab Schritt (1) appliziert. Im Anschluss wird das Medium durch TMRE-haltiges Medium (100  $\mu$ M) ersetzt. NECA bzw. SB216763 werden ab Schritt (2) während des gesamten weiteren Versuches zugegeben. Nach 20 Minuten wird das farbstoffhaltige Medium durch 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enthaltendes Medium ersetzt (3). Nach 40-minütiger Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erfolgt dann die Messung des TMRE-Signals am FACS (4).

# 2.2.3.3 Messung des mitochondrialen Membranpotentials nativer Kardiomyozyten

Die Versuche mit nativen Kardiomyozyten erfolgten frühestens nach 18 Stunden Inkubation im Brutschrank. Durch diese Vorinkubation sollten sich die Zellen vom Stress des Isolationsprozesses erholen und zum Versuchszeitpunkt in einem stabilen Zustand befinden. Die Versuche wurden nach dem oben beschriebenen Versuchsprotokoll durchgeführt und umfassten folgende Messgruppen: Np (*no peroxide*), Kontrolle, NECA (1  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 1 mM), Inhibitor, Inhibitor und NECA (siehe Abb. 2.3). Bei den Zellen der Np-Gruppe wurde im Gegensatz zu den anderen Messgruppen nach der Beladung mit TMRE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>–freies Medium zugegeben. Diese Gruppe diente zur Prüfung der Integrität der Zellen. Die nur mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelte Kontrollgruppe diente als Vergleichsgruppe für die Zellgruppen, die zusätzlich mit NECA und/oder einem Inhibitor behandelt wurden. Folgende Inhibitoren kamen zum Einsatz: SB216763 (SB21: 100 nM, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M), SB415286 (SB41: 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M), Lithiumchlorid (LiCl: 100  $\mu$ M, 3 mM, 6 mM), Wortmannin (Wort: 100 nM, 1  $\mu$ M) und PP2 (1  $\mu$ M).

# 2.2.3.4 Messung des mitochondrialen Membranpotentials adenoviral transfizierter Kardiomyozyten

Die mit den GSK-3β-Varianten transfizierten Zellen wurden nach 72 Stunden Inkubation für die Messung verwendet, da zu diesem Zeitpunkt alle GSK-3β-Varianten exprimiert wurden. Auch für diese Versuchsreihen wurde das in Abschnitt 2.2.3.2 beschriebene Versuchsprotokoll verwendet. Es wurden die folgenden Messgruppen analysiert: Np (*no peroxide*), Kontrolle, SB216763 (Droge) oder PP2 (Inhibitor), transfizierte Zellen, transfizierte Zellen und SB216763 (Droge) bzw. PP2 (Inhibitor) (siehe Abb. 2.4). Für die Np-, Kontroll- und SB216763- bzw. Inhibitor-Gruppe wurden drei Tage alte untransfizierte Zellen eingesetzt.



Abb. 2.4: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls zur Messung des ΔΨm adenoviral transfizierter/untransfizierter Zelle: a) nP-Gruppe, b) Kontroll-Gruppe, c) SB216763 (Droge) oder PP2 (Inhibitor) d) GSK-3β transfizierte Zellen, e) GSK-3β transfizierte Zellen und SB216763 (Droge) oder PP2 (Inhibitor).

# 2.2.4 Statistik

Die erhobenen Daten wurden mit dem Programm *Sigma Stat* (SPSS Inc., Chicago, USA) ausgewertet. Angegeben wurden Mittelwerte mit Standardabweichung vom Mittelwert (SEM, *Standard Error of the Mean*). Der Vergleich zwischen den einzelnen Messgruppen wurde mittels *one-way-ANOVA* mit *Fisher's LSD post hoc Test* durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden p-Werte < 0,05 bewertet.

# 3 Ergebnisse

GSK-3β spielt eine wichtige Rolle bei der Protektion des Myokards vor dem Ischämie-/Reperfusionsschaden. Man geht davon aus, dass die protektiven Signalkaskaden bei Prä- und Postkonditionierung ischämischer Herzen mit einer Inaktivierung von GSK-3β einhergehen. Infolge dessen soll die Bildung der mPTP verhindert und somit das Myokard vor den Folgen von Ischämie und Reperfusion geschützt werden.

Wie in Kapitel 1.4 erläutert, konnte im Rahmen von Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe die protektive Wirkung einer GSK-3 $\beta$ -Inhibition bestätigt werden. Weiterhin konnte belegt werden, dass eine Aktivierung membranständiger Rezeptoren (z.B. Adenosinrezeptoren,  $\delta$ -Opioidrezeptoren) während der Reperfusion zu einem Myokardschutz führt, der durch eine Inaktivierung von GSK-3 $\beta$  vermittelt wird. Studien unserer Arbeitsgruppe mit ischämischen, *ex vivo* perfundierten Herzen lieferten außerdem Hinweise auf eine Abhängigkeit der GSK-3 $\beta$ -vermittelten Protektion von PI3K und Src.

Ziel dieser Arbeit war es, anhand eines Zellmodells die genaue Stellung intrazellulärer Kinasen bei der rezeptorvermittelten Signaltransduktion zu untersuchen. Abb. 3.1 zeigt den postulierten Signalweg der rezeptorvermittelten Schutzwirkung des Adenosinrezeptoragonisten NECA, die an der Signaltransduktion beteiligten Kinasen sowie die im Rahmen der Versuche eingesetzten Wirkstoffe. Die Bindung von NECA an den membranständigen Adenosinrezeptor führt zur Inaktivierung von GSK-3β. Anschließend wird über Aktivierung von PI3K und Src die Formierung der mPTP verhindert.


Abb.3.1: Hypothetischer Ablauf der NECA-vermittelten Signaltransduktion, die zum Schutz des Myokards führt. Die im Rahmen der Versuche eingesetzten Wirkstoffe sind gekennzeichnet.

Es wurde ein in vitro-Modell zur Simulation des oxidativen Stresses während der Reperfusion in adulten Rattenkardiomyozyten etabliert. In diesem Modell wurde der oxidative Stress durch Inkubation der Myozyten mit 100 µM H2O2 simuliert. In Folge des Peroxidstresses kommt es durch Öffnung der mPTP zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta \Psi_m$ ), wodurch der Tod der Zelle irreversibel eingeleitet wird. Zusätzlich wurden die Zellen mit dem mitochondrienspezifischen Fluoreszenzfarbstoff TMRE beladen. Die TMRE-Fluoreszenzintensität der beladenen Zellen ist proportional zum  $\Delta \Psi_m$  und verringert sich mit abnehmendem Potential. Die zytometrische Messung der TMRE-Fluoreszenzintensität nach Belastung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konnte deshalb als Indikator für eine mPTP-Öffnung und damit für die Reaktion der Myozyten auf den oxidativen Stress eingesetzt werden. Pro Versuchsreihe wurden mindestens drei unabhängige Versuche (mindestens drei Zellisolationen) durchgeführt. Im ersten Teil der Arbeit wurde anhand dieses in vitro-Modells die Reaktion der auf Peroxidbelastung mittels pharmakologischer Inhibitoren bzw. Myozyten Aktivatoren untersucht. Im zweiten Teil der Arbeit wurden Kardiomyozyten adenoviral mit verschiedenen Varianten von GSK-3ß transfiziert und der Einfluss der modifizierten Enzyme auf das Zellüberleben unter Peroxidstress untersucht.

## 3.1 Beeinflussung der Aktivität von GSK-3β durch pharmakologische Enzyminhibition

In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, inwieweit sich die vielfach demonstrierte schützende Wirkung einer pharmakologischen GSK-3β-Inhibition im *in vitro*-Zellmodell bestätigen lässt. Des Weiteren sollte die Stellung der GSK-3β in einem adenosinrezeptorvermittelten Signalweg und ihre Verbindung zu PI3K und Src verifiziert werden.

Als Inhibitoren von GSK-3 $\beta$  wurden SB216763, SB415286 und Lithiumchlorid verwendet. Zunächst wurde die Dosis-Wirkungs-Beziehung von SB216763 ermittelt. Hierbei wurden Konzentrationen von 100 nM, 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M eingesetzt. Kardiomyozyten, die über eine Dauer von 40 Minuten mit 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert wurden (Kontrolle), zeigten im Vergleich zu nicht mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten, TMRE-geladenen Zellen (nP) eine um circa 80 % verminderte mittlere Fluoreszenzintensität (468,2 ± 34,7 vs. 111,8 ± 20,1 <sup>#</sup>p<0,001). Eine Behandlung mit 100 nM SB216763 hatte keinen protektiven Effekt, da die mittlere Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrolle nur geringfügig höher lag (143,4 ± 36,0 ns vs. Kontrolle). Demhingegen waren höhere Konzentrationen SB216763 in der Lage, die Kardiomyozyten vor einem Fluoreszenzverlust und somit vor einem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Zusammenbruch des  $\Delta \Psi_m$  zu bewahren. So führten sowohl 1  $\mu$ M als auch 10  $\mu$ M SB216763 zu einer signifikant höheren mittleren Fluoreszenzintensität (292,5 ± 33,5 (1 $\mu$ M) und 337,5 ± 32,9 (10 $\mu$ M); \*\*\*\* p<0,001 vs. Kontrolle). Abb. 3.2 zeigt eine graphische Darstellung der erhobenen Daten, die in Tab. 3.1 (siehe Anhang) zusammengefasst sind.



Abb.3.2: Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (Mittlewerte ± SEM) TMREbeladener Myozyten nach 40 Minuten Peroxidstress: Die Behandlung mit 1 μM bzw. 10 μM SB216763 schützt die Myozyten vor Peroxidstress, wobei 10 μM SB216763 eine stärkere protektive Wirkung zeigen. Im Vergleich zur Kontrolle initiieren 100 nM SB216763 keine Schutzwirkung.

Für die nachfolgenden Versuche wurde SB216763 in einer Konzentration von 1  $\mu$ M eingesetzt, da es bei dieser Konzentration eine protektive Wirkung zeigte, Nebeneffekte durch eine hohe Dosierung aber vermieden werden sollten.

Abb. 3.3 zeigt repräsentative Histogramme von drei in dieser Versuchsreihe gemessenen Gruppen. Dargestellt sind nP (a), Kontrolle (b) und die mit 1  $\mu$ M SB216763 behandelte Messgruppe (c). Es sind jeweils drei Zellpopulationen zu erkennen. Population I zeigt eine hohe Fluoreszenzintensität, die auf ein intaktes  $\Delta \Psi_m$ schließen lässt. Population II hat eine verringerte und Population III eine sehr niedrige Fluoreszenzintensität. Die nicht mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelte nP-Gruppe zeigt eine deutlich erkennbare Population I. Es ist dementsprechend ein großer Anteil an Zellen mit hoher Fluoreszenzintensität, d.h. mit intaktem  $\Delta \Psi_m$ , vorhanden. Unter Peroxidstress kommt es zu einer Linksverschiebung der Kurve, da die Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur Verringerung des  $\Delta \Psi_m$  der Kardiomyozyten führt. Bei Behandlung mit 1  $\mu$ M SB216763 kann eine schützende Wirkung der GSK3- $\beta$ -Inaktivierung beobachtet werden, da sich die Verschiebung der Kurve nach links verringert.



Abb.3.3: Dargestellt sind repräsentative Histogramme nach Messung der mittleren Fluoreszenzintensität TMRE-beladener Myozyten: Bei der nP-Messgruppe (a) sind deutlich Zellen der Population I mit intaktem  $\Delta \Psi_m$  zu erkennen. Bei der Kontroll-Gruppe (b) findet eine peroxidinduzierte Linksverschiebung der Kurve statt, die durch Behandlung mit 1 µM SB216763 teilweise verhindert wird.

SB415286, ein weiterer Inhibitor von GSK-3 $\beta$ , wurde in Konzentrationen von 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M eingesetzt. Im Vergleich zur Kontrolle verhindert die Gabe von 5  $\mu$ M SB415286 (212,8 ± 35,1 vs. 112,7 ± 13,5 (Kontrolle); \*\*p< 0,01) das Absinken der mittleren Fluoreszenzintensität. Im Gegensatz dazu verhindern weder 1  $\mu$ M noch 10  $\mu$ M SB415286 den Fluoreszenzverlust infolge der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Belastung (98,6 ± 17,6 (1  $\mu$ M) bzw. 88,7 ± 19,9 (10  $\mu$ M); ns vs. Kontrolle). Abb. 3.4 zeigt eine graphische Darstellung der erhobenen Daten, die in Tab. 3.2 (siehe Anhang) zusammengefasst sind.



 Abb.3.4: Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (Mittlewerte ± SEM) TMREbeladener Myozyten nach 40 Minuten Peroxidstress: Die Applikation von 5 μM SB415286 zeigt einen schützenden Effekt auf die Zellen. Dem hingegen führt die Inkubation mit 1 μM bzw. 10 μM SB415286 nicht zur Protektion der Myozyten vor Peroxidstress.

Zusätzlich zu den relativ spezifischen GSK-3 $\beta$ -Inhibitoren wurde die Wirkung des unspezifischen Blockers Lithiumchlorid auf das  $\Delta \Psi_m$  untersucht. Lithiumchlorid wurde in Konzentrationen von 100  $\mu$ M, 3 mM und 6 mM eingesetzt. Bei Applikation von 3 mM und 6 mM Lithiumchlorid zeigten die Myozyten eine ähnliche mittlere Fluoreszenzintensität wie die Kontrollgruppe (124,9 ± 16,7 (3 mM) bzw. 118,7 ± 23,1 (6 mM) vs. 125,6 ± 19,8 (Kontrolle); ns vs. Kontrolle). Nach Gabe von 100  $\mu$ M Lithiumchlorid konnte zwar eine etwas höhere mittlere TMRE-Fluoreszenzintensität beobachtet werden, dieser Unterschied war verglichen mit der Kontrolle jedoch nicht signifikant (173,3 ± 46,8; ns vs. Kontrolle). Somit hatte Lithiumchlorid in keiner der hier eingesetzten Konzentrationen einen positiven Einfluss auf das  $\Delta \Psi_m$ . Abb. 3.5 zeigt eine graphische Darstellung der beschriebenen Daten, die in Tab. 3.3 (siehe Anhang) zusammengefasst sind.



Abb.3.5: Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (Mittlewerte ± SEM) TMREbeladener Myozyten nach 40 Minuten Peroxidstress: Die Behandlung mit 3 mM bzw. 6 mM Lithiumchlorid schützt die Myozyten nicht vor dem Peroxidstress. Mit 100 μM Lithiumchlorid inkubierte Zellen zeigen eine Verringerung des Fluoreszenzverlustes. Dieser Unterschied ist im Vergleich zur Kontrolle jedoch nicht signifikant.

Es konnte somit gezeigt werden, dass eine pharmakologische Inhibition von GSK-3 $\beta$  durch SB216763 (1  $\mu$ M; 10  $\mu$ M) und SB415286 (5  $\mu$ M) die Kardiomyozyten vor dem Zusammenbruch des  $\Delta \Psi_m$  unter Peroxidstress schützt. Die Behandlung mit Lithiumchlorid hatte keinen signifikanten protektiven Effekt.

## 3.1.1 Untersuchung der Signaltransduktion zwischen Adenosinrezeptor und mPTP unter Betrachtung von GSK-3β, PI3K und Src

Die rezeptorvermittelte Signaltransduktion sollte am Beispiel des Adenosinrezeptors untersucht werden. Ziel war es, die durch Rezeptoraktivierung vermittelte Signaltransduktion mithilfe des Adenosinrezeptoragonisten NECA auszulösen. Aufgrund von Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe wurde angenommen, dass GSK3- $\beta$ , PI3K und Src wichtige Elemente der Signaltransduktion unterhalb des Rezeptors darstellen (siehe Kapitel 1.4). Durch die zusätzliche Applikation pharmakologischer Inhibition dieser Kinasen sollte ihre Position in der NECA-vermittelten Signaltransduktion untersucht werden. Zunächst wurde geprüft, ob eine Behandlung mit dem Adenosinrezeptoragonisten NECA die Kardiomyozyten unter Peroxidstress vor einem  $\Delta \Psi_m$ -Zusammenbruch bewahrt. Bei keiner der hier eingesetzten NECA-Konzentrationen (1 µM, 500 µM und 1 mM) konnte im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant höhere mittlere Fluoreszenzintensität festgestellt werden (158,6 ± 29,7 (1 µM); 200,7 ± 48,0 (500 µM) und 238,6 ± 47,7 (1 mM) vs. 148,2 ± 28,5 (Kontrolle); ns vs. Kontrolle). Zwar bewirkte die höchste Konzentration von 1 mM eine deutlich verminderte Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität, der Unterschied war aber auch hier im Vergleich zur Kontrolle mit p=0,06 nicht statistisch signifikant. Abb. 3.6 zeigt eine graphische Darstellung der erhobenen Daten, die in Tab. 3.4 (siehe Anhang) zusammengefasst sind.



Abb.3.6: Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (Mittlewerte ± SEM) TMREbeladener Myozyten nach 40 Minuten Peroxidstress: Die Behandlung mit 1 μM bzw. 500 μM NECA schützte die Myozyten nicht vor dem Peroxidstress. Bei Gabe von 1 mM NECA konnte ein deutlicher protektiver Effekt festgestellt werden, der Fluoreszenzverlust war gegenüber der Kontrolle jedoch nicht signifikant verringert.

Da die Myozyten im verwendeten Zellmodell nicht durch eine Behandlung mit NECA vor dem Peroxidstress geschützt werden konnten, konnte die Signaltransduktion zwischen Adenosinrezeptor und mPTP und die mögliche Beteiligung von GSK-3β, PI3K und Src auf diesem Weg nicht untersucht werden.

## 3.1.2 Untersuchung der GSK-3β-vermittelten Signaltransduktion unter Betrachtung von PI3K und Src

Durch Behandlung mit dem GSK-3 $\beta$ -Inhibitor SB216763 kann die Infarktgröße ischämischer *ex vivo* perfundierter Kaninchenherzen signifikant gesenkt werden. Versuche unserer Arbeitsgruppe hatten in diesem Modell eine Abhängigkeit des SB216763-vermittelten Schutzes von PI3K und Src gezeigt, da spezifische Inhibitoren dieser Kinasen den protektiven Effekt der GSK-3 $\beta$ -Inhibition aufheben konnten. Da diese Befunde im Widerspruch zu bereits publizierten Studien stehen, sollten unsere Ergebnisse in einem zweiten Modell verifiziert werden. Aus diesem Grund wurde die Wirkung des PI3K-Inhibitions Wortmannin (100 nM und 1  $\mu$ M,) und des Src-Inhibitors PP2 (1  $\mu$ M) in dem von uns etablierten Zellmodell der peroxidinduzierten Reduktion des  $\Delta\Psi_m$  in Abhängigkeit von einer GSK-3 $\beta$  Inaktivierung mittels SB216763 untersucht.

Die alleinige Gabe von SB216763 führte wie erwartet zu einer signifikanten Verminderung des Fluoreszenzverlustes gegenüber der Kontrolle ( $256,2 \pm 29,4$  vs. 135,3  $\pm 24,9$ ; p< 0,01\*\* vs Kontrolle). Eine zusätzliche Inkubation SB216763 behandelter Myozyten mit 100 nM bzw. 1 µM Wortmannin konnte die durch SB216763 verursachte Verminderung des Fluoreszenzverlustes nicht blockieren ( $234,5 \pm 37,5$  (100 nM) und  $201,5 \pm 31,6$  ( $1\mu$ M); ns vs. SB216763). Da allein mit Wortmannin behandelte Zellen an sich eine deutlich höhere mittlere Fluoreszenzintensität zeigten ( $187,3 \pm 44,2$  (100 nM) bzw.  $174,20 \pm 34,6$  ( $1 \mu$ M); ns vs. Kontrolle), ist dieser Inhibitor jedoch als kritisch zu bewerten. Dementsprechend wurde er aus weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Somit konnte bezüglich der Stellung der PI3K in dem GSK- $3\beta$ -vermittelten Zellschutz keine Aussage getroffen werden. Abb. 3.7 zeigt eine graphische Darstellung der erhobenen Daten, die in Tab. 3.5 (siehe Anhang) zusammengefasst sind.



Abb.3.7: Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (Mittlewerte  $\pm$  SEM) TMREbeladener Myozyten nach 40 Minuten Peroxidstress: Die protektive Wirkung von SB216763 kann durch gleichzeitige Applikation von 100 nM bzw. 1  $\mu$ M Wortmannin nicht beeinflusst werden. Außerdem zeigen die Myozyten nach Inkubation mit Wortmannin alleine schon eine höhere mittlere Fluoreszenzintensität, sodass dieser Inhibitor von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurde.

Die im Vergleich zur Kontrolle signifikant höhere mittlere Fluoreszenzintensität mit SB216763 behandelter Kardiomyozyten konnte durch zusätzliche Gabe von 1  $\mu$ M PP2 nicht blockiert werden (226,2 ± 50,4 (SB21) und. 222,9 ± 52,8 (PP2) vs. 72,9 ± 20,8 (Kontrolle); \*p <0,05 vs. Kontrolle). Eine alleinige Behandlung der Myozyten mit PP2 zeigte keine Beeinflussung des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Fluoreszenzverlustes (71,9 ± 9,6; ns vs. Kontrolle). Somit konnte die Hemmung von Src den schützenden Effekt der GSK-3 $\beta$  Inaktivierung nicht aufheben. Abb. 3.8 zeigt eine graphische Darstellung der beschriebenen Daten, die in Tab. 3.6 (siehe Anhang) zusammengefasst sind.



Abb.3.8: Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (Mittlewerte  $\pm$  SEM) TMREbeladener Myozyten nach 40 Minuten Peroxidstress: Der Src-Inhibitor PP2 (1  $\mu$ M) kann die protektive Wirkung von SB216763 nicht blockieren. Die Inkubation der Zellen mit PP2 alleine zeigt keinen Effekt auf den peroxidinduzierten Fluoreszenzverlust.

## 3.2 Beeinflussung der Aktivität von GSK-3β mittels adenoviraler Transfektion mit genetischen Varianten von GSK-3β

GSK-3 $\beta$  nimmt eine Sonderstellung in der Signaltransduktion ein, da sie sich in der Zelle unter normalen Bedingungen im aktivierten Zustand befindet. Durch ihre Inaktivierung während der Reperfusion kommt es zum Schutz des Myokards vor dem Ischämie-/Reperfusionsschaden. Um die Rolle von GSK-3 $\beta$  näher zu untersuchen, ist es notwendig, eine Methode zur spezifischen Aktivierung bzw. Inaktivierung des Enzyms zu besitzen. Derzeit steht jedoch kein pharmakologischer Aktivator von GSK-3 $\beta$  zur Verfügung. Des Weiteren ist bei pharmakologischer Beeinflussung eines Enzyms nie eine absolute Spezifität gegeben. Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war es daher, durch genetische Modifikation von GSK-3 $\beta$  eine hochspezifische Methode zur Beeinflussung ihrer Aktivität zu erhalten. Aus diesem Grund wurden Kardiomyozyten mittels adenoviraler Transfektion zur Expression von genetisch modifizierten Varianten von GSK-3 $\beta$  in Form einer Wildtyp (wt-), dominant negativen (dn-) und konstitutiv aktiven (ca-) Enzymvariante angeregt. Wt-GSK- $3\beta$  sollte als Kontrolle dienen und zeigen, welchen Einfluss die adenovirale Transfektion auf die Kardiomyozyten hat. Eine Transfektion mit der dominant negativen Form sollte, analog einer pharmakologischen Inhibition, eine Inaktivierung von GSK- $3\beta$  ermöglichen, während das Ziel der Transfektion mit der konstitutiv aktiven Variante eine irreversible Aktivierung des Enzyms darstellte.

## 3.2.1 Überprüfung der Expression der transfizierten GSK-3β-Varianten mittels Western Blot-Analyse

Um die Proteinexpression der einzelnen GSK-3β-Varianten sicherzustellen, wurden Myozyten adenoviral mit diesen transfiziert und 72 Stunden inkubiert. Der Expressionsnachweis erfolgte nach Präparation eines Proteinlysates durch Western Blot Analyse. Als Kontrollgruppe wurden untransfizierte Myozyten mitgeführt.

Die Differenzierung zwischen endogenem und transfiziertem GSK-3 $\beta$  erfolgte anhand der Proteingröße. Das endogene GSK-3 $\beta$  zeigt bei ca. 42 kDa eine Bande. Da die für die GSK-3 $\beta$ -Varianten kodierende DNA-Sequenz bei der Herstellung der Vektoren mit einer für das *green fluorescence protein* kodierenden DNA-Sequenz verbunden wurde, sind die transfizierten GSK-3 $\beta$ -Varianten größer als die endogene GSK-3 $\beta$ . Beim Western Blot ist daher bei den transfizierten Zellen eine Doppelbande zu erwarten. Hierbei stellt die obere Bande das größere, transfizierte und die untere das kleinere endogene Protein dar.

Zunächst wurde ein Antikörper verwendet, der sowohl die phosphorylierte als auch die nicht phosphorylierte Form der GSK-3 $\beta$  detektiert (anti-GSK-3 $\beta$ -AK) (Siehe Abb. 3.9). Die transfizierten Zellen zeigten bei der erwarteten Proteinmasse eine deutliche Doppelbande, die auf die Expression der jeweiligen GSK-3 $\beta$ -Variante hinwies. Untransfizierte Kardiomyozyten zeigten wie erwartet eine einfache Bande, die dem endogen exprimierten Protein entspricht. Somit konnte nachgewiesen werden, dass nach 72 Stunde Kultivierung alle drei Varianten der exogenen GSK-3 $\beta$  exprimiert werden.



Abb. 3.9: Repräsentativer Western Blot zur Kontrolle der Expression der GSK3β-Varianten in transfizierten Myozyten. Bei Inkubation mit dem anti-GSK-3β–AK weisen untransfizierte Myozyten nur die Bande des endogenen GSK-3β auf. Anhand der deutlich erkennbaren Doppelbanden in den transfizierten Zellen konnte die erfolgreiche Expression aller drei Fusionsproteine nach 72 Stunden nachgewiesen werden.

Bei der Herstellung der Enzymvarianten war eine Aminosäuresubstitution herbeigeführt worden, um eine dauerhaft inaktive (dn-GSK-3 $\beta$ , Lys-85-Arg) und eine dauerhaft aktive (ca-GSK-3 $\beta$ , Ser-9-Ala) Variante von GSK-3 $\beta$  zur erhalten. Aufgrund dieser Veränderungen des Enzyms ist eine Unterscheidung der GSK-3 $\beta$ -Varianten anhand ihres Phosphorylierungsmusters möglich. Um eine nähere Charakterisierung des Phosphorylierungsmusters zu erhalten folgte daher die Detektion von GSK-3 $\beta$  mit einem phosphospezifischen GSK-3 $\beta$ -Antikörper gegen Serin 9 (anti-phospho-GSK-3 $\beta$ (Ser<sup>o</sup>)-AK ) (siehe Abb. 3.10). Da auch in ruhenden Zellen ein gewisser Anteil von GSK-3 $\beta$  in phosphorylierter Form vorliegt, sind bei Inkubation mit dem anti-phospho-GSK-3 $\beta$  (Ser<sup>o</sup>) Doppelbanden zu erwarten. Dies konnte für dn- und wt-GSK-3 $\beta$ transfizierte Zellen gezeigt werden. Das Proteinlysat aus ca-GSK-3 $\beta$ -transfizierten Kardiomyozyten zeigte dem hingegen keine Doppelbande, da bei dieser Variante Serin 9 gegen Alanin ausgetauscht wurde und deshalb an dieser Position keine Phosphorylierung mehr möglich ist. Wie erwartet war bei der untransfizierten Kontrollgruppe ebenfalls keine Doppelbande detektierbar.



Abb. 3.10: Repräsentativer Western Blot zur Untersuchung des Phospholierungsmusters adenoviral transfizierter Myozyten mittels anti-phospho-GSK-3β(Ser9)-AK. Alle Proben weisen die einfache (untere) Bande des endogenen GSK-3β auf. Wt-GSK-3β und dn-GSK-3β zeigen zudem eine starke Phosyphorylierung, während ca-GSK-3β aufgrund seiner veränderten Aminosäurefrequenz nicht phosphoryliert werden kann und somit keine Doppelbande aufweist. (Freundlicheweise zur Verfügung gestellt von Dr. K. Förster.)

## 3.2.2 Untersuchung wt-GSK-3β-transfizierter Kardiomyozyten unter Peroxidstress

Anhand der Western Blot Analyse konnte die sichere Expression aller drei GSK-3β-Varianten nach 72 Stunden nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden alle Messungen mit transfizierten Myozyten 72 Stunden nach der Infektion durchgeführt. Das Versuchsprotokoll entsprach dem zuvor verwendeten Protokoll.

Um zu überprüfen, ob Transfektion und Proteinsynthese und die Kultivierung der Myozyten über 72 Stunden das Ergebnis der Messungen beeinflussen, wurden die Zellen mit wt-GSK-3 $\beta$  transfiziert. Diese nicht modifizierte Variante von GSK-3 $\beta$  sollte die Reaktion der Zellen auf die Belastung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nicht beeinflussen.

Sowohl die nicht transfizierten Kardiomyozyten als auch solche, die nach Transfektion wt-GSK-3 $\beta$  exprimierten, zeigten im Vergleich zur nicht mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten nP-Gruppe nach dem Peroxidstress eine signifikante Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität von über 50 % (102,5 ± 12,1 (Kontrolle) bzw. 134,7 ± 27,5 (wt-GSK-3 $\beta$ ) vs. 292,6 ± 22,4 (nP); jeweils <sup>#</sup>p < 0,001 vs. nP ). Eine Behandlung beider Gruppen mit SB216763 (1 µM) führte zu einer signifikanten Verringerung des Fluoreszenzverlustes (208,0 ± 29,0 (SB21) vs. Kontrolle; <sup>\*</sup>p < 0,05 bzw. 209,0 ± 23,7 (SB21 und wt-GSK-3 $\beta$ ) vs. Kontrolle; <sup>\*\*</sup>p<0,01). Die über drei Tage kultivierten und transfizierten Zellen reagieren somit in ähnlicher Weise auf den Peroxidstress wie die

nach nur kurzer Inkubationszeit untersuchten Kardiomyozyten. Auch die protektive Wirkung von SB216763 konnte für transfizierte und untransfizierte Kardiomyozyten gezeigt werden. Somit konnte kein negativer Einfluss durch eine adenovirale Transfektion beobachtet werden. Abb. 3.11 zeigt eine graphische Darstellung der erhobenen Daten, die in Tab. 3.7 (siehe Anhang) zusammengefasst sind.



Abb. 3.11: Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (Mittelwerte ± SEM) TMREbeladener Myozyten nach 40 Minuten Peroxidstress: Durch den Peroxidstress kommt es bei der Kontrolle im Vergleich zur nP–Gruppe zu einer deutlichen Schädigung der Zellen. Die Behandlung mit SB216763 schützt die wt-GSK-3β transfizierten Myozyten in gleichem Maße wie die untransfizierten Zellen.

## 3.2.3 Untersuchung dn-GSK-3β-transfizierter Kardiomyozyten unter Peroxidstress

Durch Austausch von Lysin an Position 85 gegen Arginin ist eine Aktivierung der dn-GSK-3β nicht möglich. In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob diese hoch spezifische Methode der Inhibition von GSK-3β eine schützende Wirkung hat. Die dn-GSK-3β transfizierten Zellen zeigten ähnlich wie die mit SB216763 behandelten

Myozyten eine im Vergleich zur Kontrolle signifikant höhere mittlere Fluoreszenzintensität (216,8  $\pm$  26,1 (dn-GSK-3 $\beta$ ) vs. 102,5  $\pm$  12,1 (Kontrolle); \*\*p<0,01 bzw. 208,0  $\pm$  29,0 (SB21); \*p < 0,05 vs. Kontrolle). Bei einer zusätzlichen

Gabe von SB216763 scheinen sich die protektiven Effekte teilweise zu addieren, da die mittlere Fluoreszenzintensität hier noch etwas höher als bei den einzelnen Gruppen (SB216763 bzw. dn-GSK-3 $\beta$ ) lag (267,3 ± 18,9; \*\*\*p<0,001 vs. Kontrolle). Abb. 3.12 zeigt eine graphische Darstellung der erhobenen Daten, die in Tab. 3.8 (siehe Anhang) zusammengefasst sind.



Abb. 3.12: Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (Mittelwerte  $\pm$  SEM) TMREbeladener Myozyten nach 40 Minuten Peroxidstress: Die Transfektion mit dn-GSK-3 $\beta$  verhindert in einem der pharmakologische Inhibition entsprechendem Maße den peroxidinduzierten Fluoreszenzverlust. Bei Behandlung dn-GSK-3 $\beta$ transfizierte Myozyten mit SB216763 ist ein geringer additiver Effekt zur beobachten.

Um zu untersuchen, ob dn-GSK-3 $\beta$ -transfizerte Kardiomyozyten in gleicher Weise wie untransfizierte Zellen auf die Behandlung mit einem pharmakologischen Inhibitor und die Hemmung von Src reagieren, erfolgte die Inkubation von mit dn-GSK-3 $\beta$ transfizierten Zellen mit dem Src-Inhibitor PP2. Überraschenderweise stellte sich heraus, dass auch PP2 in drei Tage kultivierten Kardiomyozyten einen Eigeneffekt hervorruft. Es zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutliche Verringerung des Fluoreszenzverlustes (209,0 ± 58,2 vs. 94,5 ± 16,1 (Kontrolle); ns vs. Kontrolle). Auch wenn im Vergleich zur Kontrolle keine Signifikanz festgestellt werden konnte, ist dieser Effekt als kritisch zur bewerten. Die Inkubation von dn-GSK-3 $\beta$  transfizierten Myozyten mit PP2 konnte die Verringerung des Fluoreszenzverlustes infolge der dn-GSK-3 $\beta$ -Transfektion nicht aufheben (183,5 ± 40,5 (dn-GSK-3 $\beta$  und PP2); \*p<0,05 vs. Kontrolle bzw. 203,2 ± 27,6 (dn-GSK-3 $\beta$ ); \*\*p < 0,01 vs. Kontrolle). Abb. 3.13 zeigt eine graphische Darstellung der erhobenen Daten, die in Tab. 3.9 (siehe Anhang) zusammengefasst sind.



Abb. 3.13: Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (Mittelwerte ± SEM) TMREbeladener Myozyten nach 40 Minuten Peroxidstress: Bei Inkubation nicht transfizierter Myozyten mit PP2 kann im Vergleich zu Kontrollgruppe eine deutlich höhere mittlere Fluoreszenzintensität gemessen werden. Die protektive Wirkung der dn-GSK-3β lässt sich mittels PP2 nicht blockieren.

## 3.2.4 Untersuchung ca-GSK-3β-transfizierter Kardiomyozyten unter Peroxidstress

Mittels der ca-GSK-3 $\beta$ -Variante, die aufgrund eines Aminosäureaustausches an Positon 9 (Ser9Ala) nicht inaktiviert werden kann, sollte eine irreversible Aktivierung von GSK-3 $\beta$  erreicht werden. Es sollte auch getestet werden, inwieweit das Vorliegen einer konstitutiv-aktiven Variante der GSK-3 $\beta$  in der Lage ist, eine durch SB216763-vermittelte Protektion zu inhibieren.

Durch Expression von ca-GSK-3 $\beta$  konnte die SB2167633-vermittelte Verringerung des Fluoreszenzverlustes unter Peroxidstress nicht blockiert werden (259,0 ± 33,9 (ca-GSK-

3β und SB21); <sup>\*\*</sup>p<0,01 vs. 102,5 ± 12,1 (Kontrolle) bzw. 208,0 ± 29,0 (SB21); <sup>\*</sup>p<0,05 vs. Kontrolle). Die Transfektion mit ca-GSK-3β selbst wirkte sich auf die untersuchten Zellen nicht aus und diese zeigten eine der Kontrollgruppe entsprechende Fluoreszenz (127,6 ± 18,4; ns vs. Kontrolle). Abb. 3.14 zeigt eine graphische Darstellung der erhobenen Daten, die in Tab. 3.10 (siehe Anhang) zusammengefasst sind.



Abb. 3.14: Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (Mittelwerte  $\pm$  SEM) TMREbeladener Myozyten nach 40 Minuten Peroxidstress: Die alleinige Transfektion mit ca-GSK-3 $\beta$  beeinflusste die Reaktion der Myozyten auf den Peroxidstress nicht. Ca-GSK-3 $\beta$  konnte die durch SB21673-vermittelte Protektion der Myozyten nicht blockieren.

Somit konnte der SB216763-vermittelte Schutz der Kardiomyozyten durch Transfektion mit ca-GSK-3 $\beta$  nicht aufgehoben werden. Die Transfektion mit ca-GSK-3 $\beta$  zeigte keinen Einfluss auf das Zellüberleben.

#### 4 Diskussion

Der akute Myokardinfarkt stellt mit einer Inzidenz von ca. 300 Infarkten/100.000 Menschen und einer Mortalität von 40 % eine Herausforderung für die moderne Medizin dar. Zwar konnte die Infarktsterblichkeit in den vergangenen Jahren mithilfe besserer Aufklärung und Vernetzung, prähospitaler Akuttherapie und Lysetherapie bzw. PTCA deutlich gesenkt werden. Dennoch besteht weiterhin Bedarf an neuen therapeutischen Möglichkeiten, um die Folgen des akuten Myokardinfarktes zu verringern.

Die Arbeitsgruppe von Murry zeigte erstmalig, dass durch eine ischämische Präkonditionierung (IPC) von Herzen die Infarktgroße nach der Reperfusion signifikat gesenkt werden kann. Hierbei wurden ischämische Hundeherzen vor der Ischämie wiederholten kurzen Zyklen von Ischämie und Reperfusion unterzogen (80). Ein ähnliches Konzept zur Myokardprotektion entdeckten Zao et al. mit der ischämischen Postkonditionierung (IPost). Mittels wiederholter Zyklen aus Ischämie und Reperfusion, denen die Herzen im Anschluss an die Indexischämie unterzogen wurden, konnte analog zur IPC eine Myokardprotektion erreicht werden (138). Auch die Behandlung ischämischer Herzen mit verschiedenen pharmakologisch aktiven Substanzen wie z.B. Adenosin (71,118) vor und während der Reperfusion hat eine der IPC ähnliche Schutzwirkung. Die Entdeckung dieser neuen Ansätze zum Schutz des Myokards vor dem Ischämie-/Reperfusionsschaden ermöglichten es, Infarktgröße und Postinfarktkomplikationen zu verringern. Sie lösten umfangreiche Forschungen auf diesem Gebiet aus, mit dem Ziel, die molekularbiologischen Mechanismen der Konditionierung ischämischer Herzen aufzuklären und neue Therapiemöglichkeiten zu erlangen.

Im Rahmen von Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe an *ex vivo* perfundierten Kaninchenherzen wurden wichtige Elemente der Signaltransduktion während der Reperfusion ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass eine pharmakologische Aktivierung membranständiger Rezeptoren wie des Adenosinrezeptors mittels des Rezeptoragonisten NECA, eine infarktreduzierende Wirkung hat. Als wichtiges Element der protektiven Signaltransduktion während der Reperfusion wird die GSK-3 $\beta$  angesehen, da sie die protektive Wirkung zahlreicher Signalwege zu vermitteln scheint (58). Sie nimmt eine Sonderstellung ein, da sie im Gegensatz zu anderen protektiv

wirkenden Enzymen in der ruhenden Zelle aktiv ist. Die aktive GSK-3 $\beta$  weist eine basale Phosphorylierung an Thyrosin 216 auf und durch Phosphorylierung an Serin 9 kommt es zur Inaktivierung des Enzyms (33). Die Inaktivierung von GSK-3 $\beta$  vermittelt über noch ungeklärte Zwischenschritte die Formierung der mPTP (79). Diese Pore bildet sich infolge des Ischämie-/Reperfusionsschadens und ihre Öffnung leitet irreversibel den Tod der Zelle ein (49). Durch Hemmung der Porenöffnung kann die Zelle somit vor dem Zelltod geschützt werden. Versuche unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass diese protektive Wirkung der GSK-3 $\beta$ -Inaktivierung mittels Inhibitoren von PI3K und Src aufgehoben werden konnte. Diese Ergebnisse weisen auf eine Lokalisierung von PI3K und Src unterhalb von GSK-3 $\beta$  hin. Anhand dieser Daten wurde der in Abb. 4.1 dargestellte hypothetische Weg der rezeptorvermittelten Signaltransduktion während der Reperfusion erstellt. Die Aktivierung des Adenosinrezeptors führt zur Inhibition von GSK-3 $\beta$  und durch eine nachgeschaltete Aktivierung von PI3K und Src zur Hemmung der mPTP.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die, durch den Adenosinrezeptoragonisten NECA-vermittelte, Signaltransduktion auf zellulärer Ebene untersucht werden. sollte Bedeutung von GSK-3β, Insbesondere die ihre Stellung in der rezeptorvermittelten Signaltransduktion und ihre Beziehung zu PI3K und Src betrachtet werden. Hierzu wurde ein kardiomyozytenbasiertes in vitro Modell zur Simulation des oxidativen Stresses während der Reperfusion etabliert. Des Weiteren sollte durch Einbringen genetischer Varianten von GSK-3ß eine hoch spezifische Methode zur Aktivierung und Inaktivierung der Kinase etabliert werden. Die für die GSK-3β-Varianten kodierenden Gene wurden durch adenovirale Transfektion in die Zellen eingebracht und ihr Einfluss anhand des Zellmodells untersucht.



Abb.4.1: Hypothetischer Ablauf der NECA-vermittelten Signaltransduktion, die zum Schutz des Myokards führt.

#### 4.1 In vitro-Zellmodell adulter Rattenkardiomyozyten

Isolierte adulte Kardiomyozyten finden häufig Anwendung bei der Erforschung der ischämischen Herzerkrankung. Ein erstes in vitro-Modell zur Untersuchung der myokardialen Ischämie mithilfe isolierter Kardiomyozyten etablierte die Arbeitsgruppe von Vander Heide (124). Zur Induktion einer Ischämie wurden die Kardiomyozyten mit Mineralöl überschichtet und deren Reaktionen anhand der ATP- und Laktatkonzentrationen, der Zellmorphologie und dem Zelltod beurteilt. Die Gruppe um Armstrong führte an einem ähnlichen Zellmodell erste erfolgreiche Versuche zur Präkonditionierung isolierter Kaninchenkardiomyozyten durch. So verringerte eine Präinkubation der Kardiomyozyten in glukosefreiem Medium vor Überschichtung mit Mineralöl den Zelltod nach der Ischämie um 40 % (7). Auch wenn Versuche mit inbzw. ex vivo perfundierten Herzen den Goldstandard der aktuellen Forschung darstellen, sind isolierte Kardiomyozyten eine etablierte Methode. Modelle isolierter Zellen sind gut geeignet um Mechanismen auf zellulärer Ebene und zellphysiologische Vorgänge unter kontrollierten Bedingungen zu erforschen. Einflussfaktoren wie Hämodynamik, humorale Substanzen, Diffusionsschranken durch Endothelien, Zell-Zell-Interaktionen sowie der Einfluss metabolischer Produkte anderer Zellgruppen wie Endothelzellen, Fibrinozyten und Immunzellen können ausgeschaltet werden. Auch kann auf einfache und kostengünstige Weise eine große Anzahl von Zellen untersucht werden und der Einsatz teurer Substanzen ist aufgrund kleinerer benötigter Mengen eher möglich. So eignet sich das Modell einerseits zur Erprobung neuer, potentiell wirksamer Substanzen als auch zur Überprüfung am perfundierten Herzen erhobener Daten. Des Weiteren sind einzelne Zellen für molekular genetische Modifikationen, z.B. durch adenovirale Transfektion, gut zugänglich. Da der Ischämie-/Reperfusionsschaden Folge des Zusammenspiels der oben genannten Faktoren ist, unterliegt die Methode jedoch auch Einschränkungen, denn sie stellt lediglich ein Modell dar, das die physiologischen Vorgänge nur unvollständig abbilden kann, da sie wichtige Einflussfaktoren ausschließt. So sind die oben genannten Faktoren für die Entstehung des Ischämie-/Reperfusionsschadens von Bedeutung (98).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Zellmodell basierend auf isolierten, adulten Rattenkardiomyozyten etabliert. Die Simulation des oxidativen Stresses während der Reperfusion erfolgte durch Behandlung der Zellen mit Wasserstoffperoxid. Akao et al. dass die Inkubation isolierter Rattenkardiomyozyten konnten zeigen, mit Wasserstoffperoxid in hohen Konzentrationen durch Öffnung der mPTP zum Zusammenbrechen des  $\Delta \Psi m$  und damit irreversibel zum Zelltod führt (2). Durch Inkubation mit TMRE, einem in Abhängigkeit vom ΔΨm fluoreszierenden Farbstoff (3), wurden Veränderungen des  $\Delta \Psi m$  auswertbar gemacht. Die Endwertbestimmung der mittleren TMRE-Fluoreszenz erfolgte in dieser Arbeit am Durchflusszytometer. Im Rahmen von Vorversuchen zeigte sich, dass die Myozyten nach 40 Minuten Peroxidexpostition eine stabile Abnahme des AYm aufweisen. Die Fluoreszenz von Zelltrümmern und nicht intakten Zellen wurden hierbei aufgrund ihrer geringen Größe nicht mit gemessen, sodass vorwiegend vitale Zellen beurteilt wurden und somit die Verfälschung der Messwerte verringert wurde. Durch Inkubation der Zellen mit Enzym-Inhibitoren bzw. -Aktivatoren wurde die Aktivität der ausgewählten Enzyme beeinflusst. Die Aktivität von GSK-3ß wurde außerdem mittels adenoviral tansfizierter Enzymvarianten modifiziert.

#### 4.2 Die Rolle von GSK-3β während der Reperfusion

GSK-3β war aufgrund ihrer regulatorischen Funktion im Glukosestoffwechsel eine der ersten untersuchten Kinasen. Das Interesse für das Enzym nahm weiter zu, nachdem die Beteiligung von GSK-3β an einer Vielzahl zellphysiologischer Vorgänge entdeckt worden war (17). So gilt sie als das Element vieler kardioprotektiver Signalwege, dass letztendlich die Hemmung der mPTP-Öffnung während Reperfusion vermittelt (58). Es existieren zwei Isoformen von GSK (GSK-3a und -3b) mit einer hohen Sequenzhomologie, welche im Bereich der katalytischen Zentren bei 95 % liegt. Mittels RNA-Interferenz und transgenen Mäusen konnten Juhazova et al. zeigen, dass die Betavariante der Kinase die kardioprotektive Wirkung vermittelt (58). Die Inaktivierung von GSK-3ß erfolgt durch Phosphorylierung an Serin 9, während die Phosphorylierung an Tyrosin 216 eine Aktivierung des Enzyms zur Folge hat (41). Weitere Regulationsmechanismen des Enzyms sind Interaktionen mit Trägerproteinen, Phosphorylierung der Substrate und intrazelluläre Verteilung bzw. Kompartimentierung. Es wird angenommen, dass die Funktion von GSK-3β in spezifischen Vorgängen durch diese Interaktionen gesteuert wird (57). Es sind zahlreiche Pharmaka bekannt, die die Aktivität von GSK-3β hemmen, während bisher keine Aktivatoren des Enzyms entwickelt wurden (74).

In dieser Arbeit wurden drei verschiedenen Enzyminhibitoren getestet: SB216763, SB415286 und Lithiumchlorid. SB216763 und SB415286 bewirken durch kompetitive Hemmung im ATP-bindenden Zentrum eine Inaktivierung des Enzyms durch Phosphorylierung an Serin 9 (58). Anhand von Enzymassays mit über 20 Kinasen konnte eine hohe Spezifität dieser Substanzen für GSK-3ß gezeigt werden (14,112). Dabei werden nur geringe Mengen der Substanzen benötigt, um eine GSK-3β-Hemmung zu erreichen (SB216763: IC<sub>50</sub> 0,075 µM; SB415286: IC<sub>50</sub> 0,13 µM) (14,74), wodurch das Interaktionspotential der Substanzen gering bleibt. Coghaln et. al stellten für die Insulin-induzierte Aktivierung von GSK-3ß an einem Modell humaner Leberzellen für SB216763 und SB415286 eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung fest (14). Mit SB216763 konnte in dieser Arbeit ebenfalls eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung gezeigt werden. So konnten 1 µM und 10 µM SB216763 die Kardiomyozyten schützen, wobei 10 µM die größte protektive Wirkung hatten. Dem hingegen zeigte SB415286 an Rattenkardiomyozyten ein enges Wirkspektrum mit einer U-förmigen Dosis-Wirkungsbeziehung. Bei einer Konzentration von 100 nM und 10 µM war kein Zellschutz zu erreichen, während 5 µM SB415286 den Fluoreszenzverlust infolge des Peroxidstresses signifikant verringerten. Aufgrund dieses geringen Konzentrationsspielraumes wurden die folgenden Versuche nur mit SB216763 durchgeführt. In Übereinstimmung mit anderen Arbeitsgruppen konnten wir an ex vivo

perfundierten Kaninchenherzen und am Zellmodell eine kardioprotektive Wirkung der Behandlung mit SB216763 während der Reperfusion zeigen (31,90).

Lithiumchlorid, als weiterer GSK-3β-Inhibitor, inaktiviert diese durch Kompetition mit Magnesium (62). Obwohl Lithiumchlorid vor allem GSK-3ß hemmt, beeinflusst es die Aktivität zahlreicher weiterer Enzyme, wie z.B. die Inositol-Phosphatase Posphatase, Akt und PI3K (85,111). Durch Behandlung mit Lithiumchlorid konnte bei ex vivo perfundierten Rattenherzen eine Verringerung der Infarktgröße erreicht werden (120) und Fu et. al zeigten, dass es die Apoptoserate Doxorobicin-behandelter neonataler Rattenkardiomyozyten verringert (35). In dieser Arbeit führte die Behandlung mit Lithiumchlorid nicht zu einer signifikanten Verzögerung des Zusammenbruchs des  $\Delta \Psi m$ . Aufgrund der niedrigen Bindungsaffinität von Lithiumchlorid (IC<sub>50</sub> 2mM) werden sehr hohe Konzentrationen der Substanz benötigt (14,74). Seine fehlende Wirksamkeit in dem hier verwendeten Zellmodell könnte am ehesten Folge der mit steigender Konzentration von Lithiumchlorid vermehrt auftretenden Wechselwirkungen mit anderen Enzymen und zunehmenden Toxizität der Substanz sein. Lithium in der Zelle kann akkumuliert und somit eine Verschiebung der Elektrolytkonzentrationen in Intra- und Extrazellulärraum und damit eine Veränderung des Membranpotentials hervorrufen (27,51).

Zahlreiche Arbeitsgruppen konnten am ganzen Herzen und am Zellmodell die Schutzwirkung einer GSK-3 $\beta$  Inaktivierung mittels Prä- und Prostkonditionierung zeigen (41,58,120). In dieser Arbeit konnte auch für die pharmakologische Inaktivierung von GSK-3 $\beta$  während der Reperfusion eine kardioprotektive Wirkung nachgewiesen werden.

## 4.3 Die Adenosinrezeptor-vermittelte Signaltransduktion während der Reperfusion

Die durch Adenosinrezeptoraktivierung vermittelte Signaltransduktion spielt eine wichtige Rolle bei IPC, IPost und pharmakologischer Konditionierung ischämischer Herzen. In ventrikulären Säugetierkardiomyozyten konnte die Expression von vier Rezeptorsubtypen nachgewiesen werden: A1-, A2a-, A2b- und A3-Adenosinrezeptor (34). Bei der pharmakologischen Präkonditionierung ischämischer Herzen und isolierter Kardiomyozyten mit Adenosin konnten zahlreiche Arbeitsgruppen eine

Myokardprotektion zeigen (7,66,71). Sein Einsatz während der Reperfusion führte jedoch zu widersprüchlichen Studienergebnissen. So erreichten einige Arbeitsgruppen mittels Adenosin eine Verringerung der Infarktgröße (118), während andere keinen protektiven Effekt nachweisen konnten (15,128). Diese Studienergebnisse können zum einen mit methodischen Unterschieden bei der Versuchsdurchführung, zum anderen mit hämodynamischen Effekten von Adenosin und seiner kurzen Halbwertszeit erklärt werden. Adenosin stellt somit einen eher ungeeigneten Agonisten für die Untersuchung der Signaltransduktion unterhalb des Adenosinrezeptors dar.

Durch den Einsatz verschiedener Adenosinagonisten fanden sich Hinweise auf eine große Bedeutung der A2-Adenosinrezeptoren während der Reperfusion. Bezüglich der Rolle des A2a-Adenosinrezeptors liegen kontroverse Ergebnisse vor. Mittels des A2a-Adenosinrezeptor Agonisten CGS21680 konnte an verschiedenen Tiermodellen ein schützender Effekt erzielt werden (84,107), während andere Arbeitsgruppen diesen nicht beobachteten (128). Eine Aktivierung des A2b-Adenosinrezeptors während der Reperfusion ist hingegen notwendig für die Kardioprotektion. So führte die Applikation des A2b-Adenosinrezeptoragonisten BAY60-6583 vor und während der Reperfusion zur Reduktion der Infarktgröße ischämischer Kaninchenherzen (69). Die protektive Wirkung des Adenosinrezeptoragonisten NECA während der Reperfusion konnte durch uns und andere Arbeitsgruppen bereits an ischämischen Herzen (96,128,132) als auch am Zellmodell (31) gezeigt werden. NECA weist eine Selektivität für A1/2-Adenosinrezeptoren auf. Aufgrund der hohen Affinität des Agonisten für den A2b-Adenosinrezeptor (A1-Adenosinrezeptor Ki 14 nM; A2a-Adenosinrezeptor Ki 20 nM; A2b-Adenosinrezeptor EC<sub>50</sub> 2400 nM) wirkt er vor allem über die Aktivierung dieses Rezeptors (64). Die protektive Wirkung von NECA kann sowohl durch den A2b-Adenosinrezeptor selektiven Antagonisten MRS1706 als auch den A2a-Adenosinrezeptor selektiven Antagonisten SCH58261 aufgehoben werden (127). Somit scheint die Aktivierung beider A2-Adenosinrezeptorsubtypen für die Myokardprotektion notwendig zu sein.

In dieser Arbeit konnte für die mit NECA behandelten Kardiomyozyten eine deutliche Verminderung der mittleren TMRE-Fluoreszenzintensität nach Peroxidstress gezeigt werden. Dieser Effekt war jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant. Bei Betrachtung der Einzelmessungen der aktuellen Arbeit fielen starke Schwankungen der Fluoreszenzintensitäten auf. Einige Messungen zeigten einen signifikant geringeren

- 54 -

Fluoreszenzverlust, während dies bei anderen Versuchen nicht der Fall war. Im Rahmen von Studien unserer Arbeitsgruppe mit NECA an einem ähnlichen Zellmodell, bei dem der Verlauf der TMRE-Intensitäten mittels Fluoreszenzmikroskopie verfolgt wurde, konnten wir eine signifikante protektive Wirkung dieses A1/2-Agonisten bereits zeigen (31). Die starken Schwankungen der im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessenen Fluoreszenzintensitäten sind am ehesten Folge der veränderten Messmethode und des modifizierten Versuchsprotokolls. Die Messung zu einem späteren Zeitpunkt und die mechanische Belastung der Zellen bei Trypsinierung und Messung im FACS stellen einen zusätzlichen Stress für die Kardiomyozyten dar. Aufgrund dieser Problematik entschieden wir uns, keine weiteren Messungen mit NECA durchzuführen. Somit konnte die Beziehung zwischen GSK-3 $\beta$  und Adenosinrezeptoren nicht weiter untersucht werden.

Es ist bekannt, dass GSK-3β an der Signaltransduktion zahlreicher G-Proteingekoppelter Rezeptoren beteiligt ist (33,58). So konnte nachgewiesen werden, dass die Inaktivierung von GSK-3ß für den Schutz der IPC (82) und IPost (37) notwendig ist. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur Phosphorylierung des Enzyms mit NECAbehandelten ischämischen Kaninchenherzen zeigten einen Anstieg der zytosolischen Phosho-GSK-3β (30). Dem hingegen konnte die Arbeitsgruppe von Xi an isolierten Rattenherzen keinen Einfluss von NECA auf die Phosphorylierung der zytosolischen GSK-3ß feststellen. Sie konnte allerdings eine Zunahme der mitochondrialen Phospho-GSK-3ß nachweisen, die durch Koinkubation mit dem A2a-Adenosinrezeptoragonisten SCH58261 und dem A2b-Adenosinrezeptorantagonisten MRS1706 verhindert werden konnte (127). Eine Beteiligung von GSK-3β an der NECA-vermittelten Signaltransduktion ist daher wahrscheinlich. Zur Klärung, ob die zytosolische und/oder mitochiondriale GSK-3ß für die Myokardprotektion von Bedeutung ist, sind weitere Untersuchungen notwendig. Auch eine Translokation des Enzyms ins Mitochondrium muss in Betracht gezogen werden, da GSK-3β unter anderem durch Kompartimentierung reguliert wird (33).

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten eine Abhängigkeit des GSK-3β-vermittelten Schutzes von PI3K und Src. An ischämischen Kaninchenherzen konnten die Inhibitoren Wortmannin und PP2 die durch Inaktivierung von GSK-3β erreichte Verringerung der Infarktgröße blockieren. Am in dieser Arbeit eingesetzten Zellmodell hatte die Applikation von PP2 allerdings keinen Einfluss auf die durch GSK-3β-vermittelte Verzögerung des Zusammenbrechens des  $\Delta\Psi$ m. Auch Wortmannin veränderte die Reaktion mit SB216763 behandelter Kardiomyozyten auf den Peroxidstress nicht. Die alleinige Applikation des Wirkstoffes zeigte jedoch wider Erwarten ebenfalls eine Verzögerung des Zusammenbrechens des  $\Delta\Psi$ m. An einem Modell *ex vivo* perfundierter Rattenherzen konnte die Arbeitsgruppe von Gross keine protektive Reaktion des Wirkstoffs feststellen (41). Somit kann diese paradoxe Wirkung von Wortmannin nicht mit einer für die eingesetzte Tierspezies spezifischen Wirkung dieser Substanz erklärt werden. Es scheint sich eher um eine für das in dieser Arbeit eingesetzte Zellmodell spezifische Wirkung zu handeln. Zur Klärung dieser Problematik sind vergleichende Versuche mit Wortmannin an anderen Zellmodellen notwendig. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit Wortmannin konnten aufgrund dieser Eigenwirkung nicht zur weiteren Klärung der Fragestellung beitragen.

Die PI3K, als Kinase des RISK-Signalweges, hat eine große Bedeutung für die Kardioprotektion. Die Arbeitsgruppen um Hausenloy und Solenkova konnten an ex vivo perfundierten Herzen eine Abhängigkeit des durch IPC (47), NECA (132) bzw. Adenosin (113) vermittelten Schutzes von einer Aktivierung der PI3K während der Reperfusion zeigen. In den genannten Studien konnte die Verringerung der Infarktgröße mittels Blockade der PI3K verhindert werden. Hauseloy et al. wiesen außerdem infolge der IPC eine Akt-Phosphorylierung während der Reperfusion nach, die durch den PI3K-Inhibitor Ly294002 verhindert werden konnte (47). Akt, als Signalement unterhalb von PI3K, gilt als Indikator für die Aktivierung dieser Kinase (77,115). Auch die Reduzierung der Infarktgröße isolierter Rattenherzen mittels IPost konnte durch die PI3K-Inhibitoren Ly294002 und Wortmannin aufgehoben werden (122). Die durch unsere Arbeitsgruppe gezeigte Abhängigkeit des GSK-3<sup>β</sup>-vermittelten Schutzes von einer Aktivierung der PI3K widerspricht den Ergebnissen der aktuellen Literatur. So wiesen Tong et al. eine Phosphorylierung von GSK-3ß infolge einer Aktivierung der PI3K nach (120). Auch andere Arbeitsgruppen fanden Hinweise auf eine Positionierung von GSK-3ß unterhalb von PI3K. Gross et al. konnten die protektive Wirkung der Behandlung ischämischer Rattenherzen mit SB216763 nicht durch Inhibition von PI3K Wortmannin bzw. Ly294002 aufheben (41). Auch mittels während der Postkonditionierung mit Isofluran und Adrenomedullin konnte eine Abhängigkeit der Protektion von einer Aktivierung der Kinasen des RISK Signalweges und eine durch GSK-3ß vermittelte Hemmung der mPTP gezeigt werden (28,137). Anhand der in unserer Arbeitsgruppe erhobenen Daten konnte der beschriebene Widerspruch bzgl. der Position von PI3K im Bezug auf GSK-3β nicht weiter aufgeklärt werden. Somit sind weiterführende Untersuchungen nötig, die im Rahmen dieser Arbeit aber nicht durchgeführt werden konnten.

Auch Src wird eine Bedeutung bei der IPC zugeschrieben. So konnte die durch Acetylcholin induzierte Phosphorylierung von Akt durch den Src-Inhibitor PP2 verhindert werden. (66). An einem Modell neonataler Rattenkardiomyozyten zur Simulation von Ischämie und Reperfusion, konnten Mockridge et al. die Abhängigkeit der Akt-Phosphorylierung von Src und PI3K nachweisen (77). Bei der Kardioprotektion ex vivo perfundierter Rattenherzen mittels Ouabain konnte die Bildung von Signalkomplexen, an denen unter anderem Src und PI3K beteiligt sind, gezeigt werden (92). Auch die Gruppe von Xu stellte am Zellmodell eine Beteiligung von PI3K und Src am durch Adenosinrezeptoraktivierung vermittelten Schutz fest. So konnten Adenosin bzw. der Adenosinrezeptoragonist CGS21680 die peroxidinduzierte Depolarisation der mitochondrialen Membran bei Koinkubation mit PP2 oder Wortmannin nicht verhindern. (130). Dem hingegen konnten Quin et al. keine Beteiligung von PI3K und adenosinvermittelten Schutz Src am nachweisen (102).Die genannten Studienergebnisse beziehen sich jedoch auf die Präkonditionierung. Bezüglich der Rolle des Enzyms während der Reperfusion bzw. Postkonditionierung liegen zum jetzigen Zeitpunkt keine Studienergebnisse vor. Bei der Signaltransduktion von ICP und IPost wurden zahlreiche Parallelen, aber auch Unterschiede aufgezeigt. So fanden Yang et al. heraus, dass die Behandlung mit Acetylcholin vor der Ischämie eine protektive Wirkung hat, während es bei der pharmakologischen Postkonditionierung keine Schutzwirkung hat (132). Somit kann die von unserer Arbeitsgruppe an ex vivo perfundierten Kaninchenherzen gezeigte Abhängigkeit des GSK-3<sup>β</sup>-vermittelten Schutzes von Src in Unterschieden der Signaltransduktion von IPC und IPost begründet sein. Entgegen unseren Vorversuchen an ischämischen Herzen, konnte in der vorliegenden Arbeit keine Abhängigkeit des SB216763-vermittelten Schutzes von Src gezeigt werden. Das eingesetzte Zellmodell simuliert jedoch nur einige Aspekte der Vorgänge während der Reperfusion. Des Weiteren können der Isolationsprozess und das Fehlen von Einflussfaktoren, wie Zellinteraktionen und durch Ischämie und Reperfusion ausgeschüttete Transmitter, Einfluss auf die Reaktion der Kardiomyozyten haben. Zur weiteren Klärung dieses Widerspruches sind vergleichende Versuche an anderen

Zellmodellen als auch ischämischen Herzen notwendig. Auch ergänzende Versuche zur Untersuchung der Phosphorylierung der beeinflussten Enzyme könnten weitere Informationen liefern.

# 4.4 Beeinflussung von GSK-3β durch adenovirale Transfektion mit genetisch veränderten Varianten von GSK-3β

Trotz der geringen Wechselwirkungen von SB415286 und SB216763 mit anderen Enzymen ist beim Einsatz pharmakologischer Inhibitoren keine absolute Spezifität für GSK-3 $\beta$  gegeben. So ist es vorstellbar, dass andere Kinasen in ihrer Aktivität beeinflusst werden können. Außerdem werden aufgrund der hohen Homologie der Isoformen der Kinase sowohl die Aktivität von GSK- $\alpha$  als auch von GSK-3 $\beta$  moduliert (14). Die verschiedenen Rollen der GSK-Isoformen sind bis jetzt noch nicht ausreichend erforscht und eine Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch gleichzeitige Inaktivierung von GSK-3 $\beta$  und GSK-3 $\alpha$  ist daher möglich. Ein weiteres Problem bei der Untersuchung der Rolle von GSK-3 $\beta$  ist, dass keine Aktivatoren des Enzyms bekannt sind. Daher wurden genetisch veränderte Varianten von GSK-3 $\beta$  zu ermöglichen. Da die adenovirale Transfektion für den Gentransfer in isolierte Zellen mit 90-100% eine hohe Transduktionseffizienz aufweist (59,60) wurden die GSK-3 $\beta$ Varianten mittels adenoviraler Vektoren in die Zellen eingebracht.

Es wurden eine Wildtyp (wt), eine dominant negative (dn) und eine konstitutiv aktive GSK-3 $\beta$  (ca) Variante eingesetzt. Die erfolgreiche Transfektion der Kardiomyozyten mit den GSK-3 $\beta$ -Varianten war im Rahmen von Vorversuchen bereits auf mRNA Ebene durch Nachweis der mRNA-Transkripte nach 24h Stunden gezeigt worden. Mittels Western Blot-Analyse konnte in dieser Arbeit nach drei Tagen Kultivierung die Expression der modifizierten GSK-3 $\beta$ -Varianten in den Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Hierbei führte die Modifikation der DNA-Sequenz zu Proteinen, die etwas größer als die endogene GSK-3 $\beta$  sind. Die daher als Zeichen der erfolgreichen Expression der exogenen Proteine zu erwartende Doppelbande im Western Blot konnte bei allen drei Varianten nach 72 Stunden nachgewiesen werden. Zur Diskriminierung der unterschiedlichen Varianten wurde das Phosphorylierungsmuster von Serin an Position 9 mittels eines phosphospezifischen Antikörpers untersucht. Die wt- und die

dn-Variante zeigten kein verändertes Phosphorylierungsmuster. Da immer ein gewisser Anteil der Proteine phosphoryliert ist, stellten sich wt- und dn-GSK-3 $\beta$  auch hier als Doppelbande dar. Dem hingegen führte bei der ca-Variante der Austausch von Serin an Position 9 durch Alanin zu einem veränderten Bandenmuster. Es zeigte sich nur die kleinere Bande, die dem endogenen GSK-3 $\beta$  entsprach. Somit konnte der Nachweis erbracht werden, dass die Transfektion und Expression der entsprechenden Varianten erfolgreich war.

In den Funktionsmessungen zeigten die mit wt-GSK-3 $\beta$  transfizierten Zellen die gleiche Reaktion auf Peroxidstress wie die untransfizierten Kardiomyozyten. Eine Behandlung mit SB216763 führte in beiden Gruppen zu einem signifikanten Schutz vor dem Peroxidstress. Es konnte somit nachgewiesen werden, dass die Transfektion und Überexpression an sich die Reaktion der Kardiomyozyten auf den Peroxidstress nicht beeinflusst und somit eine geeignete Kontrolle für die Transfektionsversuche von dnund ca-GSK-3 $\beta$  zur Verfügung stand.

Durch dn-GSK-3 $\beta$  wurde eine irreversible Inaktivierung des Enzyms und damit eine der Behandlung mit SB216763 ähnliche Schutzwirkung erzielt. Eine gleichzeitige Behandlung mit SB216763 führte zu einer geringen zusätzlichen Schutzwirkung. Auch die Arbeitsgruppe von Menon et al. konnte eine protektive Wirkung durch irreversible Inaktivierung von GSK-3 $\beta$  mittels adenoviraler Transfektion einer dn-GSK-3 $\beta$ -Variante erreichen (75). Juhazova et al. inaktivierten GSK-3 $\beta$  mithilfe spezifischer siRNA und konnten ebenfalls zeigen, dass eine Hemmung des Enzyms mittels genetischer Modifikation eine kardioprotektive Wirkung hat (58). Der dn-GSK-3 $\beta$ -Virus ermöglicht somit durch hoch spezifische Inhibition von GSK-3 $\beta$  einen Schutz der Kardiomyozyten vor oxidativem Stress.

Mittels des Src-Inhibitors PP2 überprüften wir die Ergebnisse der pharmakologischen Beeinflussung von GSK-3β. PP2 beeinflusste die Schutzwirkung durch dn-GSK-3β nicht. Außerdem wurden auch die untransfizierten mit PP2 behandelten Zellen vor dem Peroxidstress geschützt. Aufgrund der Eigenwirkung des Inhibitors lassen sich keine weiteren Aussagen über die Stellung der Src im GSK-3β-vermittelten Signalweg treffen. Diese veränderte Reaktion der Kardiomyozyten scheint Folge der Kultivierung der Zellen über drei Tage zu sein. Möglicherweise hat die Virustransfektion an sich Einfluss auf metabolische Vorgänge in den Myozyten, sodass diese eine veränderte Reaktion auf PP2 zeigen. Eine Untersuchung der Wirksamkeit anderer, am Zellmodell etablierter Inhibitoren könnte zur Klärung dieser Fragestellung beitragen.

Um eine spezifische Methode zur irreversiblen Aktivierung von GSK-3β zu erhalten, wurde eine konstitutiv aktive Variante des Enzyms hergestellt. Bei dieser erfolgte ein Austausch der Aminosäure Serin an Position 9 gegen Alanin, sodass eine Inaktivierung des Enzyms durch Phosphorylierung an Serin 9 nicht möglich ist (33). Theoretisch sollte diese konstitutiv aktive Kinase den SB216763-vermittelten Schutz vor Peroxidstress wieder aufheben. Entgegen unserer Erwartungen konnten wir diesen Effekt jedoch nicht beobachten. Im Rahmen von Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte im selben Zellmodell ca-GSK-3ß die Schutzwirkung von DADLE, einem Opioidrezeptoragonisten jedoch blockieren (32). Man kann also davon ausgehen, dass die Untersuchungen an einem validen Modell durchgeführt wurden. Auch andere Arbeitsgruppen konnten durch genetische Modifikation von GSK-3ß eine Aktivierung des Enzyms erreichen. So konnten die Arbeitsgruppen von Juhazova und Gomez zeigen, dass eine pharmakologische Präkonditionierung mit Insulin (58) und eine IPost transgener GSK-3β-S9A Mäuse (37) nicht möglich ist. Die irreversible Aktivierung von GSK-3ß mittels siRNA blockiert den erythropoetinvermittelten Schutz von H9c2-Zellen vor Apoptose (86). Dem hingegen konnte die Arbeitsgruppe von Nishino an einem ähnlichen Model von GSK-3β-S9A Knock-out Mäusen trotz irreversibler Aktivierung von GSK-3 $\beta$  eine Kardioprotektion mittels IPC und IPost erreichen (83). Daraufhin durchgeführte Studien bzgl. des Einflusses der Genmodifikation auf die Entwicklung und den Organismus zeigten jedoch, dass sich während der Entwicklung der Tiere Kompensationsmechanismen ausgebildet haben, die einen alternativen protektiven Signalweg ermöglichen. So konnte nachgewiesen werden, dass die Mäuse phänotypische Veränderungen bzgl. ihrer Organfunktionen aufweisen (11). In unserem Modell kann die fehlende Blockade der SB216763-vermittelten Schutzwirkung durch ca-GSK-3ß verschiedene Ursachen haben. Es ist bekannt, dass die Behandlung mit SB216763 zu einer Phosphorylierung von GSK-3ß an Serin 9 führt (31). Durch die Modifikation von ca-GSK-3ß ist diese Phosphorylierung nicht mehr möglich und dies sollte eine Blockade der SB216763 Wirkung zur Folge haben. Ggf. existieren jedoch weitere Mechanismen über die SB216763 eine Schutzwirkung erzielt. Des Weiteren wird SB216763 zwar eine hohe Spezifität zugeschrieben, die Beeinflussung anderer, protektiv wirkender Signalelemente kann jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden.

Außerdem exprimieren die Myozyten neben dem exogenen Protein weiterhin auch die endogene GSK-3β, die möglicherweise ausreicht, um die Schutzwirkung von SB216763 zu vermitteln. Des Weiteren führt die adenovirale Transfektion zu einer transienten Expression des entsprechenden Gens. Es ist daher möglich, dass zum Untersuchungszeitpunkt bereits nicht mehr ausreichend exogenes GSK-3β vorhanden war.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von GSK-3β mittels pharmakologisch wirksamer Substanzen bzw. überexprimierter dn-GSK-3β die Myozyten vor dem Peroxidstress schützt. Des Weiteren stellt die Möglichkeit, isolierte Kardiomyozyten mit verschiedenen Varianten der GSK-3β transfizieren zu können, einen interessanten Ausgangspunkt für tiefgreifende Analysen dar, die zu einer genaueren Definition der Rolle des Enzyms in der Signaltransduktion beitragen können. Die Ergebnisse der Studien bzgl. der pharmakologischen Inaktivierung von GSK-3β (SB216763, SB415286) sowie der adenoviral induzierten Überexpression von GSK-3β-Varianten wurden im Jahr 2010 in *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* veröffentlicht (32).

#### 4.5 Ausblick

Die am Tiermodell erhobenen Daten zeigen ein großes kardioprotektives Potential der Konditionierung ischämischer Herzen, an dessen klinischer Anwendung ein großes Intresse besteht. Die Patienten stellen sich in der Regel zum Zeitpunkt der Ischämie in der Klinik vor, sodass Interventionen während Ischämie und Reperfusion von Interesse sind, während die IPC für den klinischen Alltag hingegen nicht praktikabel ist. Staat et al. fanden erste Hinweise auf eine Schutzwirkung der IPost beim Menschen. Bei Patienten, die während der Reperfusion vier Zyklen von 1-minütiger Ischämie und Reperfusion unterzogen wurden, konnte nach 72 Stunden ein um 36 % verminderter Anstieg der Kreatinkinase als Marker der kardialen Schädigung erreicht werden (114). Auch andere Arbeitsgruppen konnten ähnliche protektive Effekte einer IPost mit Verringerung der Infarktgröße, Ejektionsfraktion, Kreatinkinaselevel (131) und Verbesserung der periphereren arteriellen Flussgeschwindigkeiten (70) nachweisen.

Da eine IPost nur im Rahmen einer invasiven Katheterangiographie möglich ist, stellt die pharmakologische Konditionierung eine vielversprechende Alternative dar. Außerdem sind additive Effekte durch eine Kombinationstherapie aus pharmakologischer und ischämischer Konditionierung vorstellbar.

Einige klinische Studien konnten bereits zeigen, dass eine pharmakologische Konditionierung beim Menschen möglich ist. So konnten durch Behandlung von Patienten während der Reperfusion mit Cyclosporin (mPTP-Inhibitor) (97), Glukagonlike Petide (81), Atrialem natiuretischem Peptid (8) oder Adenosin (63,73,105) bereits kardioprotektive Effekte gezeigt werden.

GSK-3ß als Mediator vieler protektiver Signalkaskaden während der Reperfusion (58) stellt einen vielversprechenden Ansatzpunkt zur Kardioprotektion dar. Auch ist es als intrazellulär lokalisiertes Enzym interessant, da Nebenwirkungen, wie sie bei humoral aktiven Transmittern auftreten können, nicht zu erwarten sind. So führte die Therapie mit Adenosin währen der Reperfusion in der Studie von Mahaffey et al. zum Bradykardien, Arrhythmien vermehrten Auftreten von Hypotonien, und Erregungsleitungsstörungen (73). Die Wirksamkeit einer Inaktivierung des Enzyms während der Reperfusion konnte an verschiedenen Tiermodellen gezeigt werden (31,41). Klinische Studien zur möglichen protektiven Wirkung einer GSK-3β-Inaktivierung während der Reperfusion bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt wurden bisher nicht durchgeführt. Aufgrund der zahlreichen Funktionen des Enzyms bestehen Bedenken wegen möglicher Nebenwirkungen. So ist bekannt, dass eine langzeitige Hemmung von GSK-3 $\beta$  zu kardialer Hypertrophie (44,54), einem erhöhtem Malignomrisiko (52) und TNF-induzierten Nekrosen (116) führt. Der GSK-3ß Inhibitor Lithiumchlorid, welcher zur Behandlung bipolarer Störungen eingesetzt wird, scheint jedoch keine derartigen Nebenwirkungen zu haben. Allerdings wird das Medikament beim Menschen in Dosierungen eingesetzt, die wahrscheinlich keine vollständige Enzyminaktivierung bewirken. Auch ist es fraglich, ob die oben genannten Wirkungen bereits bei einer kurzzeitigen Inaktivierung von GSK-3ß im Rahmen einer kurzzeitigen Akuttherapie bei Myokardinfarkt auftreten. Um die genannten Bedenken auszuräumen, sind daher präklinische Studien zur Klärung möglicher Nebenwirkungen einer Kurzbzw. Langzeittherapie mit GSK-3β Inhibitoren notwendig, bevor diese in ersten klinischen Studien erprobt werden könnten.

#### 5 Zusammenfassung

Beim akuten Myokardinfarkt führt eine rasche Reperfusion des ischämischen Gewebes zu einer signifikanten Verringerung der Infarktgröße, sodass mittels rekanalisierender Therapien bereits eine deutliche Reduktion von Mortalität und Spätfolgen des akuten Myokardinfarktes erreicht werden konnte. Infolge der Reperfusion kommt es jedoch durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, Kalziumüberladung und erhöhter intrazellulärer Osmolarität zu einer weiteren Schädigung des Kardiomyozyten. Am Tiermodell führt eine ischämischer Prä- bzw. Postkonditionierung, d.h. eine Behandlung perfundierter Herzen durch repetitive Ischämie-/Reperfusionzyklen vor bzw. nach der eigentlichen Ischämie zu einem Schutz des Myokards vor dem Ischämie-/Reperfusionsschaden. Auch mittels zahlreicher pharmakologisch wirksamer Substanzen kann eine der Konditionierung ähnliche Schutzwirkung erreicht werden.

Vorversuche unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass ischämische Kaninchenherzen, die während der Reperfusion mit dem Adenosinrezeptoragonisten NECA behandelt wurden, eine deutliche Reduktion der Infarktgröße aufwiesen. Im Rahmen dieser Behandlung wurde zusätzlich eine Phosphorylierung der GSK-3ß detektiert, die auf eine Inaktivierung der in ruhenden Zellen aktiven Kinase hinweist. Auch eine direkte Inhibition der GSK-3β mittels SB216763 führte zu einer ausgeprägten Kardioprotektion. Dieser Schutz wiederum zeigte sich in Abhängigkeit von PI3K und Src. Ziel dieser Arbeit war es, die am ganzen Herzen erhobenen Daten an einem Modell isolierter adulter Rattenkardiomyozyten zu überprüfen und insbesondere die Stellung der GSK-3β, PI3K und Src im NECA-vermittelten Signalweg genauer zu charakterisieren. Hierfür sollten genetisch veränderte Varianten von GSK-3β (Wildtyp, dominant negativ, konstitutiv aktiv) in Kardiomyozyten überexprimiert werden und die Zellen anschließend einem der Reperfusion entsprechenden oxidativen Stress unterzogen werden. Die Messung des mitochondrialen Membranpotentials nach 40 Minuten Peroxidstress diente dabei als Marker einer irreversiblen Zellschädigung.

Die Behandlung der gestressten Kardiomyozyten mit NECA zeigte zwar eine protektive Wirkung. Diese war jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant, sodass dieser Wirkstoff bei den weiteren geplanten Versuchen leider nicht genutzt werden konnte. Dem hingegen konnte für die Inaktivierung von GSK-3β mittels der Inhibitoren SB216763 und SB415286 die protektive Wirkung im Zellmodell bestätigt werden. Da der PI3K-Inhibitor Wortmannin bereits alleine einen gewissen Schutz vor Peroxidstress bewirkte, konnte diese Substanz nicht dazu beitragen, die Stellung der PI3K imSB216763-vermittelten Schutz zu lokalisieren. Eine Inaktivierung von Src mittels PP2 hatte entgegen unseren Vorversuchen keinen Effekt auf den SB216763-vermittelten Schutz. In diesem Modell scheint Src dementsprechend nicht unterhalb der GSK-3β lokalisiert zu sein.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Kardiomyozyten mittels adenoviraler Transfektion zur Expression einer Wildtyp (wt), einer dominant negativen (dn, Lys85Arg) und einer konstitutiv aktiven (ca, Ser9Ala) Variante von GSK-3β gebracht. Da wt-GSK-3β-transfizierte Zellen unter Peroxidstress eine den untransfizierten Zellen ähnliche Reaktion zeigten, war das Zellmodell geeignet, die Reaktion der Zellen nach dn- und ca-GSK-3β Expression genauer zu untersuchen. Dn-GSK-3β transfizierte Kardiomyozyten wurden den SB216763-behandelten Zellen vergleichbar vor Peroxidstress geschützt und auch hier konnte die Schutzwirkung nicht durch Src-Inhibition blockiert werden. Entgegen der Erwartungen war ca-GSK-3β nicht in der Lage, den SB216763-vermittelten Schutz zu unterbinden, obwohl Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe bereits eine ca-GSK-3β-vermittelte Blockade des Opioidrezeptor induzierten Schutzes demonstrieren konnten.

Somit konnte in dieser Arbeit die protektive Wirkung einer Inaktivierung von GSK-3β bestätigt werden. Aussagen zur Lokalisation der Kinasen PI3K und Src konnten jedoch leider nicht getroffen werden. Für weitergehende Untersuchungen besteht aber die Möglichkeit, mittels adenoviraler Transfektion die GSK-3β-Aktivität hochspezifisch zu beeinflussen.

## 6 Literaturverezichnis

- (1) Abdallah Y, Gkatzoflia A, Gligorievski D, Kasseckert S, Euler G, Schluter KD, Schafer M, Piper HM, and Schafer C. Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca2+ storage. *Cardiovasc Res* 2006; 70[2]: 346-353.
- (2) Akao M, O'Rourke B, Teshima Y, Seharaseyon J, and Marban E. Mechanistically distinct steps in the mitochondrial death pathway triggered by oxidative stress in cardiac myocytes. *Circ Res* 2003; 92[2]: 186-194.
- (3) Akao M, Ohler A, O'Rourke B, and Marban E. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels inhibit apoptosis induced by oxidative stress in cardiac cells. *Circ Res* 2001; 88[12]: 1267-1275.
- (4) Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, and Cohen P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* 1997; 7[4]: 261-269.
- (5) Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabreysse L, Loufouat J, Robert D, and Ovize M. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 38[2]: 367-374.
- (6) Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, and Ovize M. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation* 2005; 111[2]: 194-197.
- (7) Armstrong S, Downey JM, and Ganote CE. Preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes: induction by metabolic stress and blockade by the adenosine antagonist SPT and calphostin C, a protein kinase C inhibitor. *Cardiovasc Res* 1994; 28[1]: 72-77.
- (8) Asakura M, Jiyoong K, Minamino T, Shintani Y, Asanuma H, and Kitakaze M. Rationale and design of a large-scale trial using atrial natriuretic peptide (ANP) as an adjunct to percutaneous coronary intervention for ST-segment elevation acute myocardial infarction: Japan-Working groups of acute myocardial infarction for the reduction of Necrotic Damage by ANP (J-WIND-ANP). *Circ J* 2004; 68[2]: 95-100.
- (9) Banerjee A, Locke-Winter C, Rogers KB, Mitchell MB, Brew EC, Cairns CB, Bensard DD, and Harken AH. Preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion by an alpha 1-adrenergic mechanism. *Circ Res* 1993; 73[4]: 656-670.
- (10) Boersma E, Mercado N, Poldermans D, Gardien M, Vos J, and Simoons ML. Acute myocardial infarction. *Lancet* 2003; 361[9360]: 847-858.

- (11) Boini KM, Bhandaru M, Mack A, and Lang F. Steroid hormone release as well as renal water and electrolyte excretion of mice expressing PKB/SGK-resistant GSK3. *Pflugers Arch* 2008; 456[6]: 1207-1216.
- (12) Brown MT and Cooper JA. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1287[2-3]: 121-149.
- (13) Cao Z, Liu L, and Van Winkle DM. Met5-enkephalin-induced cardioprotection occurs via transactivation of EGFR and activation of PI3K. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288[4]: H1955-H1964.
- (14) Coghlan MP, Culbert AA, Cross DA, Corcoran SL, Yates JW, Pearce NJ, Rausch OL, Murphy GJ, Carter PS, Roxbee Cox L, Mills D, Brown MJ, Haigh D, Ward RW, Smith DG, Murray KJ, Reith AD, and Holder JC. Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem Biol* 2000; 7[10]: 793-803.
- (15) Cohen MV and Downey JM. Adenosine: trigger and mediator of cardioprotection. *Basic Res Cardiol* 2008; 103[3]: 203-215.
- (16) Cohen MV, Philipp S, Krieg T, Cui L, Kuno A, Solodushko V, and Downey JM. Preconditioning-mimetics bradykinin and DADLE activate PI3-kinase through divergent pathways. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42[4]: 842-851.
- (17) Cohen MV, Yang XM, Liu GS, Heusch G, and Downey JM. Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K(ATP) channels. *Circ Res* 2001; 89[3]: 273-278.
- (18) Cohen P and Frame S. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2[10]: 769-776.
- (19) Costa AD, Garlid KD, West IC, Lincoln TM, Downey JM, Cohen MV, and Critz SD. Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circ Res* 2005; 97[4]: 329-336.
- (20) Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; 341[2]: 233-249.
- (21) Darling CE, Jiang R, Maynard M, Whittaker P, Vinten-Johansen J, and Przyklenk K. Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of ERK1/2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289[4]: H1618-H1626.
- (22) Di Lisa F, Menabo R, Canton M, Barile M, and Bernardi P. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD+ and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem* 2001; 276[4]: 2571-2575.
- (23) Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, and Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999; 399[6736]: 601-605.
- (24) Downey JM and Cohen MV. Reducing infarct size in the setting of acute myocardial infarction. *Prog Cardiovasc Dis* 2006; 48[5]: 363-371.
- (25) Downey JM, Davis AM, and Cohen MV. Signaling pathways in ischemic preconditioning. *Heart Fail Rev* 2007; 12[3-4]: 181-188.
- (26) Downey JM, Krieg T, and Cohen MV. Mapping Preconditioning's Signaling Pathways: An Engineering Approach. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1123: 187-196.
- (27) Ebadi MS, Simmons VJ, Hendrickson MJ, and Lacy PS. Pharmacokinetics of lithium and its regional distribution in rat brain. *Eur J Pharmacol* 1974; 27[3]: 324-329.
- (28) Feng J, Lucchinetti E, Ahuja P, Pasch T, Perriard JC, and Zaugg M. Isoflurane postconditioning prevents opening of the mitochondrial permeability transition pore through inhibition of glycogen synthase kinase 3beta. *Anesthesiology* 2005; 103[5]: 987-995.
- (29) Ferdinandy P, Schulz R, and Baxter GF. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev* 2007; 59[4]: 418-458.
- (30) Förster K. Mechanismen des rezeptorvermittelten Myokardschutzes nach akutem Herzinfarkt: Beteiligung von Adenosin-, d-Opioidrezeptoren und GSK-3β. Dissertation; Greifswald 2009.
- (31) Förster K, Paul I, Solenkova N, Staudt A, Cohen MV, Downey JM, Felix SB, and Krieg T. NECA at reperfusion limits infarction and inhibits formation of the mitochondrial permeability transition pore by activating p70S6 kinase. *Basic Res Cardiol* 2006; 101[4]: 319-326.
- (32) Förster K, Richter H, Alexeyev MF, Rosskopf D, Felix SB, and Krieg T. Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta prevents peroxide-induced collapse of mitochondrial membrane potential in rat ventricular myocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010; 37[7]: 684-688.
- (33) Frame S and Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 2001; 359[Pt 1]: 1-16.
- (34) Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, and Williams M. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 1994; 46[2]: 143-156.
- (35) Fu P and Arcasoy MO. Erythropoietin protects cardiac myocytes against anthracycline-induced apoptosis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2007; 354[2]: 372-378.

- (36) Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, and Chesebro JH. The Pathogenesis of Coronary Artery Disease and the Acute Coronary Syndromes. *N Eng J Med* 1992; 326[5]: 310-318.
- (37) Gomez L, Paillard M, Thibault H, Derumeaux G, and Ovize M. Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation* 2008; 117[21]: 2761-2768.
- (38) Goto M, Liu Y, Yang XM, Ardell JL, Cohen MV, and Downey JM. Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 1995; 77[3]: 611-621.
- (39) Griffiths EJ and Halestrap AP. Protection by Cyclosporin A of Ischemia/Reperfusion-Induced Damage in Isolated Rat Hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25[12]: 1461-1469.
- (40) Griffiths EJ and Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J* 1995; 307[1]: 93-98.
- (41) Gross ER, Hsu AK, and Gross GJ. Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts. *Circ Res* 2004; 94[7]: 960-966.
- (42) Halestrap AP, Clarke SJ, and Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2004; 61[3]: 372-385.
- (43) Halestrap AP, McStay GP, and Clarke SJ. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 2002; 84[2ΓÇô3]: 153-166.
- (44) Haq S, Choukroun G, Kang ZB, Ranu H, Matsui T, Rosenzweig A, Molkentin JD, Alessandrini A, Woodgett J, Hajjar R, Michael A, and Force T. Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. J Cell Biol 2000; 151[1]: 117-130.
- (45) Hausenloy D, Wynne A, Duchen M, and Yellon D. Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection. *Circulation* 2004; 109[14]: 1714-1717.
- (46) Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, and Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res* 2002; 55[3]: 534-543.
- (47) Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, and Yellon DM. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288[2]: H971-H976.

- (48) Hausenloy DJ, Wynne AM, and Yellon DM. Ischemic preconditioning targets the reperfusion phase. *Basic Res Cardiol* 2007; 102[5]: 445-452.
- (49) Hausenloy DJ and Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35[4]: 339-341.
- (50) Herold G, Melling KP Schmidt HK. Herold Innere Medizin 2011: Herzinfarkt. Gerd Herold (Hrsg.), Köln 2011: 244-254.
- (51) Hillert M, Zimmermann M, and Klein J. Uptake of lithium into rat brain after acute and chronic administration. *Neurosci Lett* 2012; 521[1]: 62-66.
- (52) Hinoi T, Yamamoto H, Kishida M, Takada S, Kishida S, and Kikuchi A. Complex formation of adenomatous polyposis coli gene product and axin facilitates glycogen synthase kinase-3 beta-dependent phosphorylation of beta-catenin and down-regulates beta-catenin. *J Biol Chem* 2000; 275[44]: 34399-34406.
- (53) Hiraishi H, Terano A, Ota S, Mutoh H, Razandi M, SugimotoT, and Ivey KJ. Role for iron in reactive oxygen species-mediated cytotoxicity to cultured rat gastric mucosal cells. *Am J Physiol* 1991; 260[4 Pt 1]: G556-G563.
- (54) Hirotani S, Zhai P, Tomita H, Galeotti J, Marquez JP, Gao S, Hong C, Yatani A, Avila J, and Sadoshima J. Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta during heart failure is protective. *Circ Res* 2007; 101[11]: 1164-1174.
- (55) Javadov SA, Clarke S, Das M, Griffiths EJ, Lim KHH., and Halestrap AP. Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. *J Physiol* 2003; 549[2]: 513-524.
- (56) Jonassen AK, Sack MN, Mjos OD, and Yellon DM. Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70S6 kinase cell-survival signaling. *Circ Res* 2001; 89[12]: 1191-1198.
- (57) Jope RS and Johnson GV. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 2004; 29[2]: 95-102.
- (58) Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL, Olson EN, and Sollott SJ. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. J Clin Invest 2004; 113[11]: 1535-1549.
- (59) Kass-Eisler A, Falck-Pedersen E, Alvira M, Rivera J, Buttrick PM, Wittenberg BA, Cipriani L, and Leinwand LA. Quantitative determination of adenovirusmediated gene delivery to rat cardiac myocytes in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90[24]: 11498-11502.

- (60) Kirshenbaum LA, MacLellan WR, Mazur W, French BA, and Schneider MD. Highly efficient gene transfer into adult ventricular myocytes by recombinant adenovirus. *J Clin Invest* 1993; 92[1]: 381-387.
- (61) Kis A, Baxter GF, and Yellon DM. Limitation of myocardial reperfusion injury by AMP579, an adenosine A1/A2A receptor agonist: role of A2A receptor and Erk1/2. *Cardiovasc Drugs Ther* 2003; 17[5-6]: 415-425.
- (62) Klein PS and Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93[16]: 8455-8459.
- (63) Kloner RA, Forman MB, Gibbons RJ, Ross AM, Alexander RW, and Stone GW. Impact of time to therapy and reperfusion modality on the efficacy of adenosine in acute myocardial infarction: the AMISTAD-2 trial. *Eur Heart J* 2006; 27[20]: 2400-2405.
- (64) Klotz KN. Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 362[4-5]: 382-391.
- (65) Korichneva I, Hoyos B, Chua R, Levi E, and Hammerling U. Zinc release from protein kinase C as the common event during activation by lipid second messenger or reactive oxygen. *J Biol Chem* 2002; 277[46]: 44327-44331.
- (66) Krieg T, Qin Q, McIntosh EC, Cohen MV, and Downey JM. Acetylcholine and adenosine activate PI3-kinase in rabbit hearts through transactivation of receptor tyrosine kinases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283[6]: H2322-H2330.
- (67) Kroemer G, Galluzzi L, and Brenner C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiological Rev* 2007; 87[1]: 99-163.
- (68) Krolikowski JG, Weihrauch D, Bienengraeber M, Kersten JR, Warltier DC, and Pagel PS. Role of Erk1/2, p70s6K, and eNOS in isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion in vivo. *Can J Anaesth* 2006; 53[2]: 174-182.
- (69) Kuno A, Critz SD, Cui L, Solodushko V, Yang XM, Krahn T, Albrecht B, Philipp S, Cohen MV, and Downey JM. Protein kinase C protects preconditioned rabbit hearts by increasing sensitivity of adenosine A(2b)-dependent signaling during early reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 43[3]: 262-271.
- (70) Laskey WK. Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a pilot study. *Catheter Cardiovasc Interv* 2005; 65[3]: 361-367.
- (71) Liu GS, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, and Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 1991; 84[1]: 350-356.

- (72) Liu Y, Tsuchida A, Cohen MV, and Downey JM. Pretreatment with angiotensin II activates protein kinase C and limits myocardial infarction in isolated rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27[3]: 883-892.
- (73) Mahaffey KW, Puma JA, Barbagelata NA, DiCarli MF, Leesar MA, Browne KF, Eisenberg PR, Bolli R, Casas AC, Molina-Viamonte V, Orlandi C, Blevins R, Gibbons RJ, Califf RM, and Granger CB. Adenosine as an adjunct to thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: results of a multicenter, randomized, placebo-controlled trial: the Acute Myocardial Infarction STudy of ADenosine (AMISTAD) trial. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34[6]: 1711-1720.
- (74) Meijer L, Flajolet M, and Greengard P. Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25[9]: 471-480.
- (75) Menon B, Johnson JN, Ross RS, Singh M, and Singh K. Glycogen synthase kinase-3beta plays a pro-apoptotic role in beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in adult rat ventricular myocytes: Role of beta1 integrins. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42[3]: 653-661.
- (76) Miki T, Cohen MV, and Downey JM. Opioid receptor contributes to ischemic preconditioning through protein kinase C activation in rabbits. *Mol Cell Biochem* 1998; 186[1-2]: 3-12.
- (77) Mockridge JW, Marber MS, and Heads RJ. Activation of Akt during simulated ischemia/reperfusion in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 270[3]: 947-952.
- (78) Moreno PR, Bernardi VH, Lopez-Cuellar J, Murcia AM, Palacios IF, Gold HK, Mehran R, Sharma SK, Nemerson Y, Fuster V, and Fallon JT. Macrophages, Smooth Muscle Cells, and Tissue Factor in Unstable Angina: Implications for Cell-Mediated Thrombogenicity in Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 1996; 94[12]: 3090-3097.
- (79) Murphy E. Inhibit GSK-3beta or there's heartbreak dead ahead. *J Clin Invest* 2004; 113[11]: 1526-1528.
- (80) Murry CE, Jennings RB, and Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74[5]: 1124-1136.
- (81) Nikolaidis LA, Mankad S, Sokos GG, Miske G, Shah A, Elahi D, and Shannon RP. Effects of glucagon-like peptide-1 in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction after successful reperfusion. *Circulation* 2004; 109[8]: 962-965.
- (82) Nishihara M, Miura T, Miki T, Tanno M, Yano T, Naitoh K, Ohori K, Hotta H, Terashima Y, and Shimamoto K. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3beta-mediated myocardial protection. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 43[5]: 564-570.

- (83) Nishino Y, Webb IG, Davidson SM, Ahmed AI, Clark JE, Jacquet S, Shah AM, Miura T, Yellon DM, AvkiranM, and Marber MS. Glycogen synthase kinase-3 inactivation is not required for ischemic preconditioning or postconditioning in the mouse. *Circ Res* 2008; 103[3]: 307-314.
- (84) Norton ED, Jackson EK, Turner MB, Virmani R, and Forman MB. The effects of intravenous infusions of selective adenosine A1-receptor and A2-receptor agonists on myocardial reperfusion injury. *Am Heart J* 1992; 123[2]: 332-338.
- (85) O'Donnell T, Rotzinger S, Nakashima TT, Hanstock CC, Ulrich M., and Silverstone PH. Chronic lithium and sodium valproate both decrease the concentration of myoinositol and increase the concentration of inositol monophosphates in rat brain. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2003; 13[3]: 199-207.
- (86) Ohori K, Miura T, Tanno M, Miki T, Sato T, Ishikawa S, Horio Y, and Shimamoto. Ser9 phosphorylation of mitochondrial GSK-3beta is a primary mechanism of cardiomyocyte protection by erythropoietin against oxidant-induced apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295[5]: H2079-H2086.
- (87) Oldenburg O, Qin Q, Krieg T, Yang XM, Philipp S, Critz SD, Cohen MV, and Downey JM. 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[1]: H468-H476.
- (88) Pain T, Yang XM, Critz SD, Yue Y, Nakano A, Liu GS, Heusch G, Cohen MV, and Downey JM. Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res* 2000; 87[6]: 460-466.
- (89) Park SS, Zhao H, Jang Y, Mueller RA, and Xu Z. N6-(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-N-methylcarboxamide confers cardioprotection at reperfusion by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening via glycogen synthase kinase 3 beta. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318[1]: 124-131.
- (90) Park SS, Zhao H, Mueller RA, and Xu Z. Bradykinin prevents reperfusion injury by targeting mitochondrial permeability transition pore through glycogen synthase kinase 3beta. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 40[5]: 708-716.
- (91) Parsons M, Young L, Lee JE, Jacobson KA, and Liang BT. Distinct cardioprotective effects of adenosine mediated by differential coupling of receptor subtypes to phospholipases C and D. *FASEB J* 2000; 14[10]: 1423-1431.
- (92) Pasdois P, Quinlan CL, Rissa A, Tariosse L, Vinassa B, Costa AD, Pierre S, Dos SP, and Garlid KD. Ouabain protects rat hearts against ischemia-reperfusion injury via a pathway involving src kinase, mitoKATP, and ROS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 292[3]: H1470-H1478.

- (93) Penna C, Cappello S, Mancardi D, Raimondo S, Rastaldo R, Gattullo D, Losano G, and Pagliaro P. Post-conditioning reduces infarct size in the isolated rat heart: role of coronary flow and pressure and the nitric oxide/cGMP pathway. *Basic Res Cardiol* 2006; 101[2]: 168-179.
- (94) Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, Raimondo S, Cappello S, Gattullo D, Losano G, and Pagliaro P. Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K+ channel and protein kinase C activation. *Basic Res Cardiol* 2006; 101[2]: 180-189.
- (95) Philipp S, Downey JM, and Cohen MV. Postconditioning must be initiated in less than 1 minute following reperfusion and is dependent on adenosine receptors and PI3-kinase. *Circulation* 2004; 110[Suppl III Abstract]
- (96) Philipp S, Yang XM, Cui L, Davis AM, Downey JM, and Cohen MV. Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade. *Cardiovasc Res* 2006; 70[2]: 308-314.
- (97) Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, Elbelghiti R, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Macia C, Raczka F, Sportouch C, Gahide G, Finet G, Andre-Fouet X, Revel D, Kirkorian G, Monassier JP, Derumeaux G, and Ovize M. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *New England Journal of Medicine* 2008; 359[5]: 473-481.
- (98) Piper HM, Garcia-Dorado D, and Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1998; 38[2]: 291-300.
- (99) Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, and Ullrich A. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 1999; 402[6764]: 884-888.
- (100) Pschyrembel W (Hrsg.). Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 259. Auflage; Walter de Gruyter, Berlin, New York 2002: 685.
- (101) Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA, and Thomas G. Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science* 1998; 279[5351]: 707-710.
- (102) Qin Q, Downey JM, and Cohen MV. Acetylcholine but not adenosine triggers preconditioning through PI3-kinase and a tyrosine kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284[2]: H727-H734.
- (103) Qin Q, Yang XM, Cui L, Critz SD, Cohen MV, Browner NC, Lincoln TM, and Downey JM. Exogenous NO triggers preconditioning via a cGMP- and mitoKATP-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287[2]: H712-H718.
- (104) Richardson PD, Davies MJ Born GV. Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *Lancet* 2012; 2[8669]: 941-944.

- (105) Ross AM, Gibbons RJ, Stone GW, Kloner RA, and Alexander RW. A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II). *J Am Coll Cardiol* 2005; 45[11]: 1775-1780.
- (106) Sale EM and Sale GJ. Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65[1]: 113-127.
- (107) Schlack W, Schafer M, Uebing A, Schafer S, Borchard U, and Thamer V. Adenosine A2-receptor activation at reperfusion reduces infarct size and improves myocardial wall function in dog heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22[1]: 89-96.
- (108) Schultz JE, Rose E, Yao Z, and Gross GJ. Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol* 1995; 268[5 Pt 2]: H2157-H2161.
- (109) Shah PK, Falk E Badimon JJ Fernandez-Ortiz A Mailhac A Villareal-Levy G Fallon JT Regnstrom J Fuster V. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation* 2012; 92[6]: 1565-1569.
- (110) Shaw M, Cohen P, and Alessi DR. Further evidence that the inhibition of glycogen synthase kinase-3beta by IGF-1 is mediated by PDK1/PKB-induced phosphorylation of Ser-9 and not by dephosphorylation of Tyr-216. *FEBS Lett* 1997; 416[3]: 307-311.
- (111) Sinha D, Wang Z, Ruchalski KL, Levine JS, Krishnan S, Lieberthal W, Schwartz JH, and Borkan SC. Lithium activates the Wnt and phosphatidylinositol 3-kinase Akt signaling pathways to promote cell survival in the absence of soluble survival factors. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288[4]: F703-F713.
- (112) Smith DG, Buffet M, Fenwick AE, Haigh D, Ife RJ, Saunders M, Slingsby BP, Stacey R, and Ward RW. 3-Anilino-4-arylmaleimides: potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). *Bioorg Med Chem Lett* 2001; 11[5]: 635-639.
- (113) Solenkova NV, Solodushko V, Cohen MV, and Downey JM. Endogenous adenosine protects preconditioned heart during early minutes of reperfusion by activating Akt. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290[1]: H441-H449.
- (114) Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, Aupetit JF, Bonnefoy E, Finet G, Andre-Fouet X, and Ovize M. Postconditioning the human heart. *Circulation* 2005; 112[14]: 2143-2148.
- (115) Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB, Painter GF, Holmes AB, McCormick F, and Hawkins PT. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* 1997; 277[5325]: 567-570.

- (116) Takada Y, Fang X, Jamaluddin MS, Boyd DD, and Aggarwal BB. Genetic deletion of glycogen synthase kinase-3beta abrogates activation of IkappaBalpha kinase, JNK, Akt, and p44/p42 MAPK but potentiates apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 2004; 279[38]: 39541-39554.
- (117) Thomas SM and Brugge JS. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997; 13: 513-609.
- (118) Todd J, Zhao ZQ, Williams MW, Sato H, VanWylen DGL, and Vinten-Johansen J. Intravascular adenosine at reperfusion reduces infarct size and neutrophil adherence. *Ann Thorac Surg* 1996; 62[5]: 1364-1372.
- (119) Tong H, Chen W, Steenbergen C, and Murphy E. Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C. *Circ Res* 2000; 87[4]: 309-315.
- (120) Tong H, Imahashi K, Steenbergen C, and Murphy E. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway is cardioprotective. *Circ Res* 2002; 90[4]: 377-379.
- (121) Towbin H, Staehelin T, and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; -Proc Natl Acad Sci U S A[9]
- (122) Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, and Yellon DM. Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res* 2004; 95[3]: 230-232.
- (123) Van der Wal AC, Becker AE, Van der Loos CM, and Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 2012; 89[1]: 36-44.
- (124) Vander Heide RS, Rim D, Hohl CM, and Ganote CE. An in vitro model of myocardial ischemia utilizing isolated adult rat myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1990; 22[2]: 165-181.
- (125) Wall TM, Sheehy R, and Hartman JC. Role of Bradykinin in Myocardial Preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 270[2]: 681-689.
- (126) Wang P, Gallagher KP, Downey JM, and Cohen MV. Pretreatment with endothelin-1 mimics ischemic preconditioning against infarction in isolated rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28[3]: 579-588.
- (127) Xi J, McIntosh R, Shen X, Lee S, Chanoit G, Criswell H, Zvara DA, and Xu Z. Adenosine A2A and A2B receptors work in concert to induce a strong protection against reperfusion injury in rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 47[5]: 684-690.

- (128) Xu Z, Downey JM, and Cohen MV. Amp 579 reduces contracture and limits infarction in rabbit heart by activating adenosine A2 receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38[3]: 474-481.
- (129) Xu Z, Mueller RA, Park SS, Boysen PG, Cohen MV, and Downey JM. Cardioprotection with adenosine A2 receptor activation at reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 46[6]: 794-802.
- (130) Xu Z, Park SS, Mueller RA, Bagnell RC, Patterson C, and Boysen PG. Adenosine produces nitric oxide and prevents mitochondrial oxidant damage in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2005; 65[4]: 803-812.
- (131) Yang XC, Liu Y, Wang LF, Cui L, Wang T, Ge YG, Wang HS, Li WM, Xu L, Ni ZH, Liu SH, Zhang L, Jia HM, Vinten-Johansen J, and Zhao ZQ. Reduction in myocardial infarct size by postconditioning in patients after percutaneous coronary intervention. *J Invasive Cardiol* 2007; 19[10]: 424-430.
- (132) Yang XM, Krieg T, Cui L, Downey JM, and Cohen MV. NECA and bradykinin at reperfusion reduce infarction in rabbit hearts by signaling through PI3K, ERK, and NO. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36[3]: 411-421.
- (133) Yang XM, Philipp S, Downey JM, and ohen MV. Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation. *Basic Res Cardiol* 2005; 100[1]: 57-63.
- (134) Yang XM, Proctor JB, Cui L, Krieg T, Downey JM, and Cohen MV. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44[5]: 1103-1110.
- (135) Yao Z and Gross GJ. Acetylcholine mimics ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in dogs. *Am J Physiol* 1993; 264[6 Pt 2]: H2221-H2225.
- (136) Yellon DM and Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *New England Journal of Medicine* 2007; 357[11]: 1121-1135.
- (137) Yin H, Chao L, and Chao J. Adrenomedullin protects against myocardial apoptosis after ischemia/reperfusion through activation of Akt-GSK signaling. *Hypertension* 2004; 43[1]: 109-116.
- (138) Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, and Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285[2]: H579-H588.
- (139) Zhao ZQ and Vinten-Johansen J. Postconditioning: reduction of reperfusioninduced injury. *Cardiovasc Res* 2006; 70[2]: 200-211.

## 7 Anhang

## 7.1 Beeinflussung der Aktivität von GSK-3β durch pharmakologische Enzyminhibition

Tab. 3.1:DarstellungderzytometrischgemessenenmittlerenTMRE-Fluoreszenzintensitätnach40-minütigerPeroxidbelastung (sieheAbb.3.2).GezeigtsinddiemittlerenFluoreszenzen ±SEMder einzelnenMessgruppenunddieSignifikanzen.

Gruppe	n	Mittelwert $\pm$ SEM	р
Np	17	$468,2 \pm 34,7$	
Kontrolle	17	$111,8 \pm 20,1$	p < 0,001 vs. Np
SB216763 100 nM	9	$143,4 \pm 36,0$	ns vs. Kontrolle
SB216763 1 µM	17	$292,5 \pm 33,5$	p < 0,001 vs. Kontrolle
SB216763 10 µM	9	$337,5 \pm 32,9$	p < 0,001 vs. Kontrolle

Tab. 3.2: Darstellung der zytometrisch gemessenen mittleren TMRE-<br/>Fluoreszenzintensität nach 40-minütiger Peroxidbelastung (siehe Abb. 3.4).<br/>Gezeigt sind die mittleren Fluoreszenzen ± SEM der einzelnen Messgruppen<br/>und die Signifikanzen.

Gruppe	n	Mittelwert $\pm$ SEM	р
Np	19	339,6 ± 41,5	
Kontrolle	20	$112,7 \pm 13,5$	p < 0,001 vs. Np
SB415286 1 µM	12	98,6 ± 17,6	ns vs. Kontrolle
SB415286 5 µM	14	$212,8 \pm 35,1$	p < 0,01 vs. Kontrolle
SB415286 10 µM	5	88,7 ± 19,9	ns vs. Kontrolle

Tab. 3.3:DarstellungderzytometrischgemessenenmittlerenTMRE-Fluoreszenzintensitätnach40-minütigerPeroxidbelastung (sieheAbb. 3.5).GezeigtsinddiemittlerenFluoreszenzen ±SEMdereinzelnenMessgruppenunddieSignifikanzen.

Gruppe	n	Mittelwert $\pm$ SEM	р
Np	13	$392,9 \pm 54,1$	
Kontrolle	14	$125,6 \pm 19,8$	p < 0,001 vs. Np
Lithiumchlorid 10 µM	7	$173,3 \pm 46,8$	ns vs. Kontrolle
Lithiumchlorid 3 mM	14	$124,9 \pm 16,7$	ns vs. Kontrolle
Lithiumchlorid 6 mM	10	$118,7 \pm 23,1$	ns vs. Kontrolle

Tab. 3.4:DarstellungderzytometrischgemessenenmittlerenTMRE-Fluoreszenzintensitätnach40-minütigerPeroxidbelastung (sieheAbb.3.6).GezeigtsinddiemittlerenFluoreszenzen ±SEMdereinzelnenMessgruppenunddieSignifikanzen.

Gruppe	n	Mittelwert ± SEM	р
Np	11	$455,9 \pm 46,4$	
Kontrolle	11	$148,2 \pm 28,5$	p < 0,001 vs. Np
NECA 1 µM	5	$158,6 \pm 29,7$	ns vs. Kontrolle
NECA 500 µM	5	$200,7 \pm 48,0$	ns vs. Kontrolle
NECA 1 mM	11	$238,6 \pm 47,7$	p < 0,062; ns vs. Kontrolle

Tab. 3.5:DarstellungderzytometrischgemessenenmittlerenTMRE-Fluoreszenzintensitätnach40-minütigerPeroxidbelastung (sieheAbb.3.7).GezeigtsinddiemittlerenFluoreszenzen ±SEMdereinzelnenMessgruppenunddieSignifikanzen.

Gruppe	n	Mittelwert $\pm$ SEM	р
Np	25	$355,2 \pm 42,9$	
Kontrolle	25	$135,3 \pm 24,9$	p < 0,001 vs. Np
SB216763 1 µM	25	$256,2 \pm 29,4$	p < 0,01 vs. Kontrolle
Wortmannin 100 nM	13	$187,3 \pm 44,2$	ns vs. Kontrolle
SB216763 1 µM/			
Wortmannin 100 nM	13	$234,5 \pm 37,5$	p < 0,05 vs. Kontrolle
Wortmannin 1 µM	12	$174,20 \pm 34,6$	ns vs. Kontrolle
SB216763 1 µM/			
Wortmannin 1 µM	12	$201,5 \pm 31,6$	ns vs. Kontrolle

Tab. 3.6: Darstellung der zytometrisch gemessenen mittleren TMRE-<br/>Fluoreszenzintensität nach 40-minütiger Peroxidbelastung (siehe Abb. 3.8).<br/>Gezeigt sind die mittleren Fluoreszenzen ± SEM der einzelnen Messgruppen<br/>und die Signifikanzen.

Gruppe	n	Mittelwert $\pm$ SEM	р
Np	7	$249,5 \pm 46,7$	
Kontrolle	7	$72,9 \pm 20,8$	p < 0,05 vs. Np
SB 216763 1 µM	7	$226,2 \pm 50,4$	p < 0,05 vs. Kontrolle
PP2 1 μM	7	$71,9 \pm 9,6$	ns vs. Kontrolle
SB216763 1 µM/			
PP2 1 μM	7	$222,9 \pm 52,8$	p < 0,05 vs. Kontrolle

## 7.2 Beeinflussung der Aktivität von GSK-3β mittels adenoviraler Transfektion mit genetischen Varianten von GSK-3β

Tab. 3.7:DarstellungderzytometrischgemessenenmittlerenTMRE-Fluoreszenzintensität nach 40-minütigerPeroxidbelastung (siehe Abb. 3.11).Gezeigt sind die mittlerenFluoreszenzen ± SEM der einzelnenMessgruppenund die Signifikanzen

Gruppe	n	Mittelwert $\pm$ SEM	р
Np	22	292,6 ± 22,4	
Kontrolle	16	$102,5 \pm 12,1$	p < 0,001 vs. Np
wt-GSK-3β	11	$134,7 \pm 27,5$	ns vs. Kontrolle
SB216763 1 µM	23	$208,0 \pm 29,0$	p < 0,05 vs. Kontrolle
wt-GSK-3β/			
SB216763 1 µM	3	$209,0 \pm 23,7$	p < 0,01 vs. Kontrolle

Tab. 3.8:DarstellungderzytometrischgemessenenmittlerenTMRE-Fluoreszenzintensität nach 40-minütigerPeroxidbelastung (siehe Abb. 3.12).Gezeigt sind die mittlerenFluoreszenzen ± SEM der einzelnenMessgruppenund die Signifikanzen.

Gruppe	n	Mittelwert $\pm$ SEM	р
Np	22	292,6 ± 22,4	
Kontrolle	16	$102,5 \pm 12,1$	p < 0,001 vs. Np
SB216763 1 µM	23	$208,0 \pm 29,0$	p < 0,05 vs. Kontrolle
dn-GSK-3β	22	$216,8 \pm 26,1$	p < 0,01 vs. Kontrolle
dn-GSK-3β/			
SB216763 1 µM	17	$267,3 \pm 18,9$	p < 0,001 vs. Kontrolle

Tab. 3.9:DarstellungderzytometrischgemessenenmittlerenTMRE-Fluoreszenzintensität nach 40-minütigerPeroxidbelastung (siehe Abb. 3.13).Gezeigt sind die mittlerenFluoreszenzen ± SEM der einzelnenMessgruppenund die Signifikanzen.

Gruppe	n	Mittelwert $\pm$ SEM	р
Np	24	266,2 ± 19,2	
Kontrolle	24	$94,5 \pm 16,1$	p < 0,001 vs. Np
dn-GSK-3β	24	$203,2 \pm 27,6$	p < 0,01 vs. Kontrolle
PP2 1 μM	7	$209,0 \pm 58,2$	ns vs. Kontrolle
dn-GSK-3 $\beta$ /PP2 1 $\mu$ M	7	$183,5 \pm 40,5$	p < 0,05 vs. Kontrolle

Tab.	<i>3.10</i> :	Darstellung	der	zytometrisch	gemessenen	mittleren	TMRE-
		Fluoreszenzir	ntensität	nach 40-minütig	er Peroxidbelas	tung (siehe A	bb. 3.14).
		Gezeigt sind	die mittl	eren Fluoreszenz	$xen \pm SEM der e$	einzelnen Mes	sgruppen
		und die Signij	fikanzen				

Gruppe	n	Mittelwert $\pm$ SEM	р
Np	22	292,6 ± 22,4	
Kontrolle	16	$102,5 \pm 12,1$	p < 0,001 vs. Np
SB216763 1 µM	23	$208,0 \pm 29,0$	p < 0,05 vs. Kontrolle
ca-GSK-3β	18	$127,6 \pm 18,4$	ns vs. Kontrolle
ca-GSK-3β/			
SB216763 1 µM	11	$259,0 \pm 33,9$	p < 0,01 vs. Kontrolle

## **Eidesstattliche Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Siegen, 02.12.2013