

Aus der/dem Klinik und Poliklinik / Institut für Kardiologie
(Direktor Univ.- Prof. Dr. med. Stephan B. Felix)

der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Einfluss von Bay 58-2667 auf den Reperfusionsschaden nach akuter Myokardischämie

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Wissenschaften in der Medizin
(Dr. rer. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2020

vorgelegt von:

Thomas Rütz

geb. am: 15.02.1976

in: Neubrandenburg

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich
1. Gutachter: Prof. Dr. med. Stephan B. Felix
2. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Lendeckel
3. Gutachter: Prof. Benjamin Meder

Ort, Raum: per Zoom anstatt HGW

Tag der Disputation: 01.03.2021

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	- 1 -
1.1	Myokardinfarkt	- 1 -
1.1.1	Ischämie	- 4 -
1.1.2	Ischämie- und Reperfusionsschaden	- 5 -
1.1.3	Ischämische Prä- und Postkonditionierung	- 9 -
1.1.4	Pharmakologische Prä- und Postkonditionierung	- 13 -
1.2	Lösliche Guanylat-Zyklase (sGC) während der Postkonditionierung	- 14 -
1.3	cAMP und cGMP Transporter ABCC 4 und 5 im Herzen	- 17 -
1.4	Aufgabenstellung	- 20 -
2	Material und Methoden	- 21 -
2.1	Material	- 21 -
2.1.1	Allgemein verwendete Chemikalien, Gase, Enzyme und Medien	- 21 -
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	- 24 -
2.1.3	Geräte und Hilfsmittel	- 24 -
2.1.4	Software	- 26 -
2.1.5	Puffer und Lösungen	- 26 -
2.1.6	Versuchstiere	- 28 -
2.1.7	Zelllinien	- 29 -
2.1.8	Antikörper	- 30 -
2.1.9	Oligonukleotide	- 30 -
2.1.9.1	Primer und Sonden für die quantitative PCR	- 30 -
2.1.9.2	siRNA-Sequenzen	- 30 -
2.1.10	Verwendete Vektoren	- 33 -
2.2	Methoden	- 35 -
2.2.1	Ex vivo perfundiertes Rattenherz	- 35 -
2.2.1.1	Operative Technik	- 35 -
2.2.1.2	Gruppeneinteilung	- 37 -
2.2.1.3	Infarktgrößenbestimmung	- 38 -
2.2.1.4	Gewinnung transmuraler Biopsien	- 39 -

2.2.1.5	Radioimmunoassay	- 39 -
2.2.2	Isolation von adulten Rattenkardiomyozyten (ARK)	- 40 -
2.2.3	Zellkultur	- 41 -
2.2.3.1	Kultivierungsmethoden	- 41 -
2.2.3.2	Zellzahlbestimmung	- 42 -
2.2.3.3	Kryokonservierung	- 42 -
2.2.3.4	Immunohistochemie	- 43 -
2.2.3.5	Transfektion mit FuGENE®	- 43 -
2.2.4	Molekularbiologische Methoden zur Genexpressionsanalyse.....	- 45 -
2.2.4.1	Isolierung der RNA	- 46 -
2.2.4.2	RNA-Konzentrationsbestimmung.....	- 46 -
2.2.4.3	TaqMan®PCR Technik.....	- 47 -
2.2.5	Gewinnung und Verwendung der siRNAs	- 52 -
2.2.5.1	siRNA-Design	- 52 -
2.2.5.2	Annealing der siRNA-Moleküle	- 53 -
2.2.5.3	Restriktion der Vektoren	- 53 -
2.2.5.4	Ligation	- 54 -
2.2.5.5	Transformation von E.coli mit Plasmiden.....	- 54 -
2.2.5.6	Klon-PCR	- 55 -
2.2.5.7	Kontrolle der Ligation	- 56 -
2.2.5.8	Isolierung von Plasmid-DNA.....	- 57 -
2.2.5.9	Sequenzierung der siRNA-enthaltenden Vektoren	- 57 -
2.2.5.10	Vervielfältigung der Plasmid-DNA	- 59 -
2.2.6	Virale Transfektion	- 59 -
2.2.6.1	Virusproduktion	- 59 -
2.2.6.2	Virusernte	- 61 -
2.2.6.3	Infektion der H4IIE Zellen	- 61 -
2.2.6.4	Kontrolle des Transfektions- und Infektionserfolges.....	- 62 -
2.2.6.5	Spezielle Isolation der Gesamt-RNA aus Zellen.....	- 62 -
2.2.6.6	Bestimmung des RNA/DNA-Gehaltes.....	- 63 -
2.2.6.7	Zytotoxizitätstest Almar Blue	- 63 -
2.2.7	Proteinanalytische Methoden.....	- 64 -
2.2.7.1	Isolation zytosolischer und membranständiger Proteine.....	- 64 -
2.2.7.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	- 64 -

2.2.7.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (Diskontinuierliche SDS-Page)	- 64 -
2.2.7.4	Western Blot Analyse von Proteinen	- 66 -
2.3	Statistik.....	- 67 -
3	Ergebnisse	- 68 -
3.1	Bay 58-2667	- 68 -
3.1.1	Bestimmung der Infarktgröße ex-vivo perfundierter Rattenherzen nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von Bay 58-2667 während der Reperfusion.....	- 68 -
3.1.2	Klärung des Wirkmechanismus von Bay 58-2667 mittels Infarktgröße ex-vivo perfundierter Rattenherzen	- 69 -
3.1.3	Hämodynamik ex-vivo, perfundierter Rattenherzen	- 72 -
3.1.4	Messung zyklischer Nukleotide mittels Radioimmunoassay	- 76 -
3.2	Etablierung einer spezifischen ABCC 4 und 5-Knockdown-Methode	- 77 -
3.2.1	Expression der ABCC 4 und 5 Transporter in Zellen und Gewebe.....	- 77 -
3.2.1.1	Bestimmung der ABCC 4-Expression mittels Western Blot Analyse	- 77 -
3.2.1.2	Bestimmung der ABCC 5-Expression mittels Immunfluoreszenz	- 78 -
3.2.1.3	Lipofektion mittels FuGENE®6 Reagent	- 80 -
3.2.1.4	siRNA-Technologie	- 82 -
4	Diskussion	- 92 -
4.1	Rolle von sGC Aktivatoren während der Reperfusion.....	- 93 -
4.2	cGMP Auswärtstransport mittels siRNA Technologie hemmen	- 98 -
5	Zusammenfassung.....	- 104 -
6	Literaturverzeichnis.....	- 106 -
7	Anhang	- 115 -
7.1	Zusammenfassung der erhobenen Daten.....	- 115 -
7.2	Abbildungsverzeichnis	- 116 -
7.3	Tabellenverzeichnis.....	- 118 -
7.4	Eidesstattliche Erklärung.....	- 119 -
7.5	Danksagung.....	- 120 -

Abkürzungsverzeichnis

<i>% (v/v)</i>	Volumenprozent
<i>% (w/v)</i>	volumenbezogenes Massenprozent
<i>°C</i>	Grad Celsius
<i>5-HD</i>	5-Hydroxydecanoat
<i>8-pCPT-cGMP</i>	8-(4-Chlorophenylthio)-Guanosin ^{3'} , ^{5'} -zyklisches Monophosphat Salz
<i>Aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
<i>Abb.</i>	Abbildung
<i>ABC-Transporter</i>	ATP binding cassette superfamily of transport proteins
<i>AC</i>	Adenylatzyklase
<i>Akt</i>	Proteinkinase B
<i>AMP</i>	Adenosinmonophosphat
<i>ATP</i>	Adenosintriphosphat
<i>BAY 58-2667</i>	4-[[[(4-Carboxybutyl)[2-[2-[[4-(2-phenylethyl)phenyl]methoxy]phenyl]ethyl]amino]methyl]benzoicacid hydrochloride
<i>bzw.</i>	beziehungsweise
<i>ca.</i>	circa
<i>cAMP</i>	zyklisches Adenosinmonophosphat
<i>cDNA</i>	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
<i>cGMP</i>	zyklisches Guanosinmonophosphat
<i>cNMP</i>	zyklisches Nukleotidmonophosphat
<i>DNA</i>	Desoxyribonukleinsäure
<i>D-PBS</i>	Dulbecco's Phosphate buffered saline
<i>DTT</i>	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
<i>EGF</i>	epidermaler Wachstumsfaktor
<i>EKG</i>	Elektrokardiogramm
<i>eNOS</i>	endothelial nitric oxide synthase
<i>env</i>	viral envelope
<i>ERK</i>	extracellular-signal regulated kinase
<i>et al.</i>	et alteri (und andere)
<i>FAM</i>	6-Carboxyfluorescein
<i>FRET</i>	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
<i>GC</i>	Guanylatzyklase
<i>G_iPCR</i>	G _i -Protein gekoppelter Rezeptor
<i>GSK-3β</i>	Glykogensynthasekinase-3β
<i>h</i>	Stunden
<i>HB-EGF</i>	heparin binding-EGF-like growth factor
<i>IgG</i>	Immunglobulin G
<i>IPC</i>	ischämische Präkonditionierung
<i>IPost</i>	ischämische Postkonditionierung
<i>kD</i>	Kilodalton
<i>KT-5823</i>	Inhibitor der PKG

<i>LAD</i>	linke Koronararterie
<i>L-NAME</i>	N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride
<i>MI</i>	Myokardinfarkt
<i>min</i>	Minute
<i>mPTP</i>	mitochondrial permeability transition pore
<i>MRP</i>	Multidrug Resistance Protein
<i>NECA</i>	5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine, Adenosin A ₁ /A ₂ Rezeptor Agonist
<i>NO</i>	Stickstoffmonoxid
<i>ORI</i>	Replikationsursprung
<i>Page</i>	Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>PBS</i>	Phosphate buffered saline
<i>PCI</i>	perkutane koronare Intervention
<i>PDE</i>	Phosphodiesterase
<i>PDK</i>	phosphatidyl abhängige Kinasen
<i>pGC</i>	partikuläre Guanylatcyclase
<i>pH</i>	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
<i>PI3K</i>	Phosphatidylinositol 3-Kinase
<i>PKA</i>	Proteinkinase A
<i>PKC</i>	Proteinkinase C
<i>PKG</i>	Proteinkinase G
<i>PMSF</i>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>PTCA</i>	Perkutane transluminale koronare Angioplastie
<i>RIA</i>	Radioimmunassay
<i>RISK</i>	reperfusion injury salvage kinase
<i>rpm</i>	Umdrehungen pro Minute
<i>ROS</i>	reaktive Sauerstoffspezies
<i>RT</i>	Raumtemperatur
<i>sek</i>	Sekunde
<i>SEM</i>	Standardfehler des Mittelwertes
<i>sGC</i>	soluble (lösliche) Guanylatcyclase
<i>Tab.</i>	Tabelle
<i>TAMRA</i>	6-Carboxytetramethylrhodamin
<i>TBS</i>	Tris buffered saline
<i>TBST</i>	Tris buffered saline Tween 20
<i>Temp.</i>	Temperatur
<i>TGF-β</i>	Transformierender Wachstumsfaktor β
<i>TMRE</i>	Tetramethylrhodaminethylester
<i>TRIS</i>	Tris(Hydroxymethyl)-aminoethan
<i>Triton X-100</i>	Ethylenglycolether
<i>UV</i>	ultraviolett
<i>VASP</i>	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
<i>VIC</i>	6-Carboxyfluorescein
<i>VSV</i>	Vesicular stomatitis virus
$\Delta\Psi_m$	mitochondriales Membranpotential

1 Einleitung

In den vergangenen 50 Jahren hat sich das Verständnis für die Ursache, Diagnostik und Behandlung ischämischer Herzerkrankungen wesentlich erweitert. Aus einer ischämischen Herzerkrankung entwickelt sich häufig ein Myokardinfarkt (MI). In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts konnte erst in der postmortalen Autopsie ein Myokardinfarkt diagnostiziert werden. In den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts entwickelten sich wissenschaftliche Grundlagen und Methoden für die Diagnostik und Behandlungsansätze ischämischer Herzkrankheiten. So wurde zunächst mit verlängerter Bettruhe und folgender körperlicher Schonung therapiert. Aber es kam auch zum lebenslangen Sitzen-Müssen des Patienten. Die durch den konservativen Behandlungsansatz assoziierte Verweildauer von Infarktpatienten in klinischen Einrichtungen wurde zur Informationsgewinnung, Datenauswertung und wissenschaftlichen Beobachtung des Krankheitsverlaufes genutzt, so dass die bisherigen Behandlungsmethoden sprunghaft innovativ entwickelt werden konnten. Dieses führte zu einem veränderten Verständnis der Pathogenese sowie zu einer dynamischen Weiterentwicklung der Behandlungsmöglichkeiten. In der Folge sank die Mortalität post MI deutlich.

Nach wie vor sind ischämische Herzerkrankungen in Deutschland die Haupttodesursache (1). Nach Schätzungen der Deutschen Herzstiftung erleiden in Deutschland jährlich ca. 280.000 Patienten einen Herzinfarkt, hiervon verlaufen trotz modernster Diagnostik und neuer Therapiemöglichkeiten 60.000 Fälle tödlich (1). Etwa ein Drittel der infarktbedingten Todesfälle ereignet sich vor Erreichen eines Krankenhauses. Todesursache ist dabei häufig ein plötzlicher Herztod durch Kammerflimmern. Nach Erreichen des Krankenhauses ist die Akutsterblichkeit mit zurzeit etwa 10 % deutlich niedriger. Die infarktbedingte intrahospitale Letalität konnte in den vergangenen 50 Jahren durch Fortschritte der medizinischen Forschung, Innovationen der Infrastruktur, durch Etablierung invasiver Verfahren (Herzkatheteruntersuchung und -therapie) sowie die medikamentöse Begleittherapie drastisch reduziert werden.

1.1 Myokardinfarkt (MI)

Der MI wird fast immer durch eine Verringerung oder gar einen Stillstand des Blutflusses in einer Region des Herzmuskels verursacht, was folglich zur Nekrose des Herzmuskels führt. Hierfür ist meistens ein Blutgerinnsel in einer epikardialen Arterie verantwortlich. Mittlerweile

ist anerkannt, basierend darauf, wie ein MI definiert ist, dass nicht alle Fälle mit einem Blutgerinnsel als Ursache verknüpft sind. In allen lebenden Geweben (wie auch im Herzmuskel) wird der Sauerstoffbedarf der Muskeln nahezu konstant durch den Blutfluss abgedeckt. Daraus ergibt sich ein Gleichgewicht aus Angebot und Nachfrage. Es wird angenommen, dass ein Ungleichgewicht in diesem Verhältnis (zu wenig Angebot oder auch zu viel Bedarf, was mit einer höheren Herzfrequenz oder mit einem Blutdruckabfall assoziiert ist) ebenfalls zu einer myokardialen Schädigung führen kann, also ohne ein Blutgerinnsel als Ursache. Die in den letzten zwei Jahrzehnten universell erarbeitete Definition des MI hilft den Klinikern bei ihren Diagnosestellungen. Diese Definition stützt sich zum einen auf den gemessenen Anstieg oder Abfall von Troponin I und T im Bluttest was sensitiv für einen Herzmuskelschaden ist. Troponin ist ein Eiweißstoff des Herzmuskels, der bei einer Schädigung der Herzmuskelzellen vermehrt in den Blutkreislauf gelangt (2). Zum anderen stützt sie sich auf weitere Symptome der Ischämie, geprüft und belegt mittels Elektrokardiogramm (EKG). Abhängig vom elektrokardiographischen Befund sowie den kardialen Markern (Creatinkinase-MB, Troponin) werden folgende Entitäten des akuten Koronarsyndroms mit aufsteigendem Risiko voneinander abgegrenzt, wobei die Übergänge fließend sein können (Abb. 1.1):

- Instabile Angina pectoris (anfallartig auftretende Schmerzen hinter dem Brustbein infolge einer Erkrankung der Herzkranzgefäße)
- ST-Strecken-Elevations-Myokardinfarkt (STEMI, ST-Hebungsinfarkt): vollständiger Verschluss eines Koronargefäßes
- Nicht-ST-Strecken-Elevations-Myokardinfarkt (NSTEMI, Nicht-ST-Hebungsinfarkt): partieller Verschluss eines Koronargefäßes

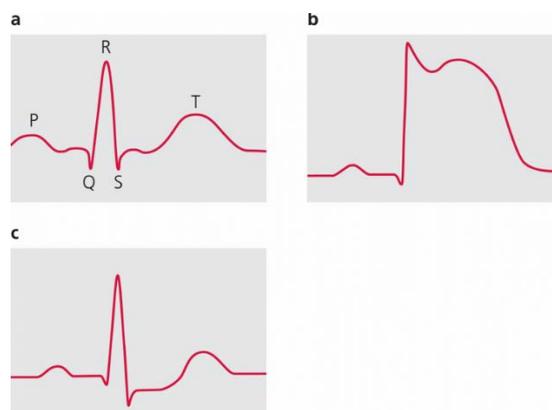


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines Elektrokardiogramms. Darstellung eines normalen Elektrokardiogramms mit P- und T-Welle sowie QRS-Komplex (a), sowie eines Myokardinfarkts mit ST-Elevation (b) und nicht ST-Elevation (c), was auf einen vollständigen oder partiellen Verschluss eines Koronargefäßes schließen lässt.

Das 12-Kanal-Elektrokardiogramm dient in der Akutsituation zur Identifizierung von Patienten mit ST-Strecken-Elevation (ST-Strecken-Hebung). Bei Patienten mit dem Leitsymptom „akuter Brustschmerz“ und typischen ST-Strecken-Anhebungen kann und muss sofort die Diagnose „ST-Strecken-Elevations-Myokardinfarkt“ gestellt werden und entsprechende Therapiemaßnahmen zur Reperfusion sind unverzüglich einzuleiten. Das EKG bildet daher die wichtigste diagnostische Grundlage für alle Entscheidungsprozesse im Umgang mit Patienten mit akutem Brustschmerz und muss daher entweder bereits vom Notarzt prästationär oder spätestens innerhalb von 10 Minuten (min) nach Ankunft im Krankenhaus abgeleitet und korrekt ausgewertet werden.

Der akute Myokardinfarkt mit ST-Strecken-Hebung ist ein kardialer Notfall mit hoher Frühsterblichkeit. In der letzten Dekade hat sich jedoch die Prognose von Patienten mit akutem Myokardinfarkt vor allem durch die Weiterentwicklung perkutan-interventioneller Techniken und der medikamentösen Therapie deutlich verbessert. In den aktuellen Leitlinien der Europäischen und der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie wird bei Patienten mit ST-Hebungsinfarkt und Symptombeginn innerhalb von 12 Stunden (h) die direkte perkutane Katheterintervention (primäre PCI [*percutaneous coronary intervention*]) als Reperusionsmaßnahme der ersten Wahl mit einem hohen Evidenzgrad empfohlen. Dies gilt im Vergleich zur prä- oder intrahospitalen Thrombolyse vor allem unter Berücksichtigung zeitlicher Vorgaben. Entscheidend ist, dass zwischen dem ersten medizinischen Kontakt (Diagnosestellung) und einer Katheter-gestützten Reperfusion des Infarktgefäßes (PCI) nicht mehr als 2 h vergehen dürfen, was hohe Anforderungen an die Logistik von Rettungsdiensten und den versorgenden Krankenhäusern darstellt. Falls diese zeitliche Obergrenze nicht eingehalten werden kann, muss möglichst sofort eine Thrombolyse eingeleitet werden, sofern hierfür keine Kontraindikation vorliegt. Auch im Falle einer erfolgreichen Thrombolyse soll innerhalb von 24 h (aber nicht früher als 3 h nach Beginn der Thrombolyse) eine Herzkatheteruntersuchung in Interventions (PCI)-Bereitschaft erfolgen.

Bei einem Nicht-ST-Strecken-Elevations-Myokardinfarkt besteht für die meisten Patienten spätestens innerhalb von 72 h nach Ersthospitalisierung ebenso die Indikation zur primär invasiven Vorgehensweise (Herzkatheteruntersuchung/ -therapie). Bei Vorliegen von Hochrisikomerkmale (z.B. bei Patienten mit refraktärer oder rezidivierender Angina pectoris zusammen mit dynamischen ST-Veränderungen, Zeichen der schweren Herzinsuffizienz, lebensbedrohlichen Arrhythmien oder hämodynamischer Instabilität) sollte diese jedoch umgehend erfolgen (in Analogie zum ST-Hebungsinfarkt).

Die direkte Katheterintervention ist bei Patienten mit einem ST-Hebungsinfarkt eindeutig die Methode der ersten Wahl. Doch auch in Deutschland können nicht alle Patienten mit einem akuten ST-Hebungsinfarkt innerhalb der notwendigen Zeitgrenzen einer Katheterintervention zugeführt werden. Für diese Patienten kommt eine Thrombolysetherapie in Betracht, sofern keine Kontraindikationen bestehen. Bei einer Thrombolyse sollte mit der Therapie idealerweise schon prähospital begonnen werden. Hierfür stehen vor allem Streptokinase, Alteplase, Reteplase und Tenecteplase zur Verfügung.

1.1.1 Ischämie

Der Begriff Ischämie, in Übersetzung aus dem Altgriechischen „Blutleere“, bedeutet, dass ein Organ oder Gewebe nicht mehr oder nur unzureichend durchblutet wird. Eine Ischämie tritt ein, wenn der Blutfluss im Gewebe reduziert oder gar gestoppt ist. Eine kardiale Ischämie von mehr als 20 min führt zum Myokardinfarkt. Die Aktivierung verschiedener Prozesse hat einen Gewebeschaden zur Folge (Abb. 1.2).

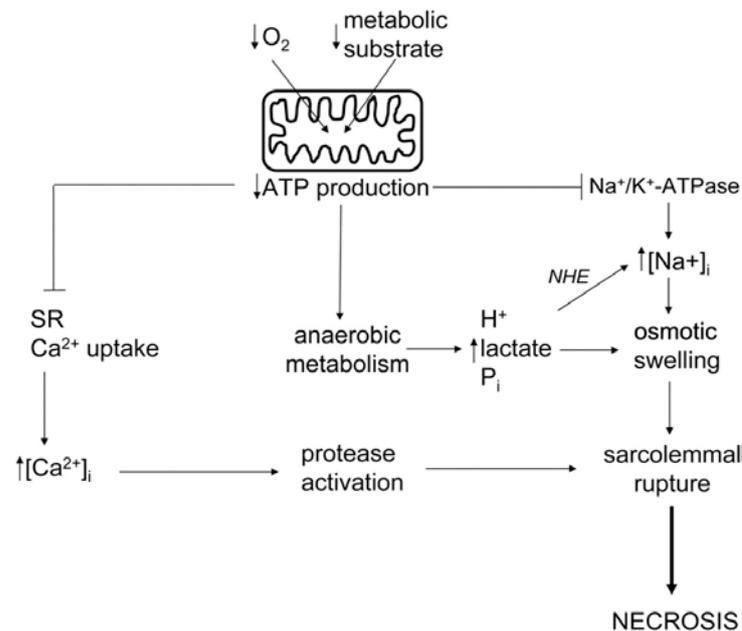


Abb. 1.2: Zelluläre Vorgänge während der Ischämie. Während der Ischämie kommt es zur Unterversorgung mit Nährstoffen, was zur Überladung mit Ca^{2+} und Na^+ , zum Anschwellen der Zellen und schließlich zur Nekrose führt (nach Ferdinandy et al. (3)).

Die Umstellung auf eine anaerobe Energiegewinnung soll dem vorprogrammierten Nährstoffverlust entgegenwirken, denn während der Ischämie kommen die aktiven Kontraktionen der Myokardzellen bald zum Erliegen. Dadurch wird der Energiebedarf der Zellen nur reduziert, aber nicht komplett aufgehoben. Die Zellen benötigen zur

Aufrechterhaltung des gesonderten, in Bezug auf Molarität und pH-Wert, stabilen Milieus im Zytosol Energie. Um die Milieudifferenzen zwischen Intra- und Extrazellulärraum zu erhalten, verfügen die Zellen über ein spezielles System verschiedener Ionenpumpen und Ionenkanäle. Einige dieser Membranproteine, unter anderem die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, sind primär aktiv, das heißt diese sind direkt ATP verbrauchende „Pumpen“. Die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ transportiert Natriumionen im Austausch gegen Kaliumionen aus dem Inneren der Zelle heraus und baut so einen Natriumgradienten über der Plasmamembran auf. Andere, die sogenannten sekundär aktiven Transporter, bedienen sich dieses Natriumgradientens, um wieder Ionen durch die Zellmembran zu transportieren und so ein konstantes Milieu im Inneren der Zelle aufzubauen. Reguliert wird die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ über die Menge des intrazellulären Natriums. Der Ausfall der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ im Rahmen einer Ischämie führt zu einem Anstieg des intrazellulären Natriumspiegels. Dies bedingt einen vermehrten Antrieb der Pumpe und damit einen weiteren Anstieg des ATP-Bedarfs. Des Weiteren bricht der Natriumgradient über der Plasmamembran zusammen. Sekundär aktive Iontentransporter fallen ebenfalls aus, was dazu führt, dass die Zellen nicht in der Lage sind, ihr besonderes intrazelluläres Milieu aufrechtzuerhalten.

1.1.2 Ischämie- und Reperfusionsschaden

Nach einer ischämischen Episode wird durch die Wiederversorgung des betroffenen Areals des Herzens mit Blut, der Reperfusion, ebenfalls ein Schaden verursacht. Dieser führt zum Tod von Zellen, die während der Ischämie nur reversibel verletzt wurden. Es wird postuliert, dass zu Beginn der Reperfusion nach einer Ischämie drei Zelltypen im Herzen ausgeprägt sind (4, 5). Zum einen die Myokardzellen, die minimale sublethale Schädigungen erlitten haben. Diese Zellen werden ohne Behandlung nach überstandener Ischämie auch die Phase der Reperfusion überleben. Des Weiteren die Zellen, die während der Ischämie einen irreversiblen Schaden erlitten und bei einsetzenden Reperfusion bereits tot sind.

Von besonderem Interesse sind die Zellen, die mit beginnender Reperfusion vital sind, aber in den ersten min der Reperfusion absterben. Diese Zellpopulation stellt den Angriffspunkt für schützende Interventionen dar, deren Entwicklung Gegenstand dieser Arbeit ist. Durch die Beeinflussung zellulärer Prozesse, beispielsweise der Aktivierung protektiver Signalkaskaden während der Präkonditionierung und/oder Postkonditionierung (siehe Kapitel 1.1.3), lässt sich diese Gruppe von Zellen retten. In Abb. 1.3 sind mögliche Schädigungen des Herzens nach unterschiedlicher Behandlung dargestellt, wobei eine möglichst frühzeitige Reperfusion und Myokardschutz das beste Resultat ergeben.

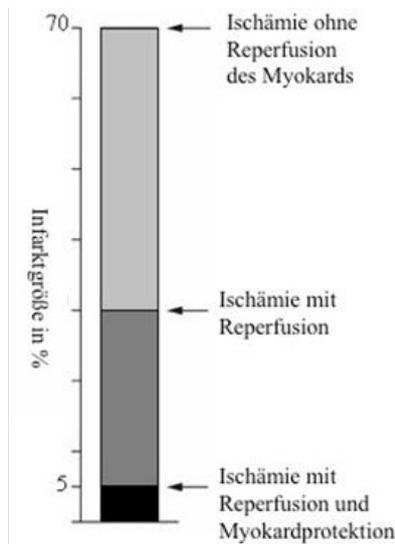


Abb. 1.3: Beitrag zur Sterblichkeit der Myokardzellen, aufgegliedert nach Schaden durch die Ischämie, Reperfusion bzw. der erzielbare Effekt der Myokardprotektion. (Modifiziert nach Yellon et. al. (5)).

Es wird angenommen, dass der Reperfusionsschaden zum einen durch freie Sauerstoffradikale und oxidativen Stress ausgelöst wird, zum anderen durch Veränderungen in der Calcium-Ionen-Homöostase und einer damit einhergehenden exzessiven kontraktilen Aktivität. Darüber hinaus gilt die Wiederherstellung des Energiehaushaltes, die rapide Normalisierung des Gewebe pH-Wertes und die schnelle Normalisierung der Gewebeosmolarität als enorme Belastung für die Herzmuskelzellen und wird als Auslöser des Schadens diskutiert. Die zellulären Mechanismen sind in Abb. 1.4 graphisch zusammengefasst.

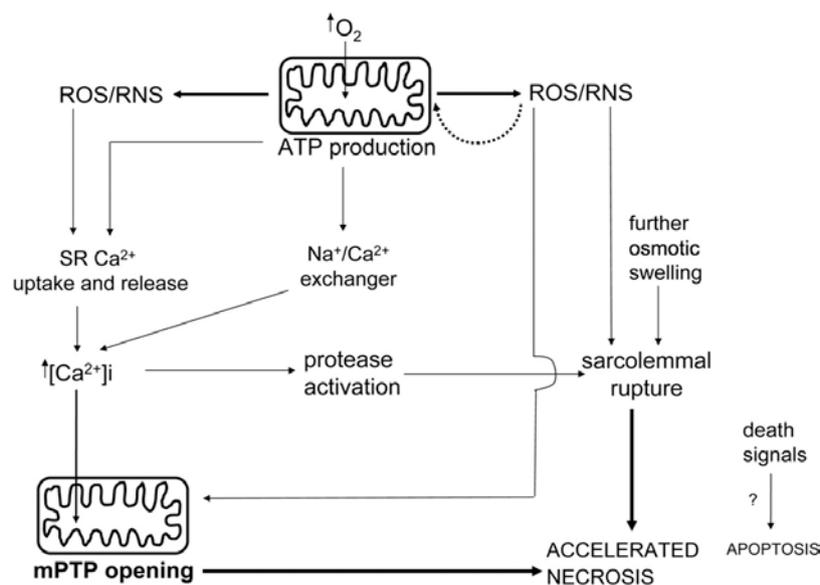


Abb. 1.4: Zelluläre Vorgänge während der Reperfusion. Während der Reperfusion kommt es aufgrund der Wiederversorgung mit Sauerstoff zur Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies, der Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) und durch weiter ansteigende Ca^{2+} Konzentration zur Nekrose (nach Ferdinandy et al. (3)).

a) Wiederherstellung des Energiehaushaltes

Der, durch die Reperfusion, verursachte Schaden stellt sich als ernsthafte myokardiale Verletzung dar. Der Schaden ist durch myofibrilläre Hyperkontraktur und sarcolemmale Disruption charakterisiert und konnte durch Hearse et al. (6) demonstriert werden. Durch den wiederhergestellten Blutfluss kommt es zur Wiederversorgung des myokardialen Gewebes. Der im Blut enthaltene Sauerstoff wird als Treiber des Schadens diskutiert. Der Prozess der Wiederversorgung mit Sauerstoff wird Reoxygenierung genannt. Dass es während der lebensnotwendigen Wiederversorgung des betroffenen Gewebes mit Sauerstoff zu ernsthaften Verletzungen kommt, wird als „Sauerstoff-Paradoxon“ bezeichnet. Während der Ischämie leiden die Herzmuskelzellen unter einem enormen Energieverlust. Aufgrund des Energiemangels steigt die zytosolische Calciumkonzentration dramatisch an. Die Wiederherstellung des Energiehaushaltes wird unter anderem durch die Versorgung der Mitochondrien mit Sauerstoff ermöglicht. Diese führt zum einen zu einer Aktivierung der kontraktilen myofibrillären Elemente der Kardiomyozyten und zum anderen (und dieser Prozess läuft nahezu simultan ab) wird verfügbare Energie genutzt, um Kationenpumpen zu aktivieren. Damit kann die zelluläre Kationenbalance wiederhergestellt werden. Des Weiteren kommt es durch die Energieunterversorgung im ischämischen Myokard zu einer vermehrten Ansammlung von Natrium- und Calciumionen im Zytosol der Kardiomyozyten (7). Durch die Reperfusion kommt es zur Wiederversorgung des Myokards mit Sauerstoff und Metaboliten. Während dieser Wiederversorgung werden nun zwei essentielle Kationenpumpen aktiviert: die Calciumionenpumpe (die Ca^{2+} -ATPase des sarcoplasmatischen Retikulums) und die Natriumionenpumpe (die Na^+/K^+ -ATPase des sarcoplasmatischen Retikulums). Die Aktivierung der Ca^{2+} -ATPase führt zu einer kurzweiligen Einlagerung des Calciumionenüberschusses. Ist die Kapazität dieser Einlagerung ausgeschöpft, wird ein weiterer Zyklus in Gang gesetzt. Es kommt zur Freisetzung von Calciumionen aus dem sarcoplasmatischen Retikulum und zur Wiederaufnahme dieser in das sarcoplasmatische Retikulum. Es entsteht so eine spontane Aktivität, welche nur endet, wenn der Hauptmechanismus des Calciumausstromes aus dem Zytosol ausreichend aktiviert wurden, also der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher in seinem „Vorwärtsmodus“ arbeitet. In diesem Modus werden Calciumionen aus der Zelle heraus- und Natriumionen in die Zelle hineingepumpt. Die Fähigkeit des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers, Calciumionen aus dem Zytosol zu transportieren, ist abhängig von dem Ausmaß des transsarcolemmalen Natriumionengradienten. Daher ist es notwendig, dass die Na^+/K^+ -ATPase schnell aktiviert wird, um den intrazellulären Natriumionenüberschuss aufzuheben.

Die Wiederherstellung des Energiehaushaltes bringt genügend metabolische Kompetenz mit sich, um die Natriumionen- und Calciumionenpumpen in der frühen Phase der Reoxygenierung wieder zu aktivieren. Dieses ist auch erforderlich, wenn die ischämischen/reperfundierten Kardiomyozyten energetisch weitgehend verarmt sind und an einer ernsthaften Calciumionen- und Natriumionenüberladung leiden.

Sollte der Schaden der Pumpen zu groß ausfallen und die intrazelluläre Calciumionenakkumulation weiter ansteigen, können die betroffenen Zellen nicht mehr genesen. Ein abgeschwächter Natriumionengradient gewährt einen weiteren Calciumioneneinstrom über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher. Die Wiederversorgung des Gewebes mit Energie, in Kombination mit dem Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration, hat schädliche Auswirkungen auf das reoxygenierte Myokard. Innerhalb der frühen Phase der Reoxygenierung ist die Calciumionenkonzentration noch erhöht. Das führt zu einer myofibrillären Aktivierung und somit zu einer Bildung von unkontrollierten, exzessiven Kräften bis auf die zelluläre Ebene. Diese Belastung kann zu einer Hyperkontraktur, d.h. zu einer irreversiblen Verkürzung der Herzmuskelzellen führen. Durch Zell-Zell-Interaktionen wird ein Ausstrahlen des Schadens im Zellverband ermöglicht und führt zu einer ernsthaften Schädigung der zytoskelettalen Strukturen des Myokards.

b) Normalisierung des pH-Wertes

Auch der zytosolische pH-Wert in den Kardiomyozyten hat einen Einfluss auf die Entwicklung einer schädlichen Hyperkontraktur. Nach der Ischämie, die im Zuge der anaeroben Metabolismen und des Ausfalls der ATP-Produktion auftritt, versauern die Zellen. Es kommt zu einem Überschuss an Wasserstoffionen, d.h. der pH-Wert ist sehr niedrig und es entsteht eine Ansäuerung in den intra- und extrazellulären Räumen. Mit Einsetzen der Reperfusion wird der pH-Wert im Interstitium, dem extrazellulären Bereich, sehr schnell normalisiert. Der entstandene Gradient zwischen dem Zytosol und dem Interstitium aktiviert, vermittelt durch Na^+/H^+ -Austauscher und $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Symporter, die Ausstrommechanismen für Wasserstoffionen. Dadurch wird die intrazelluläre Azidose reduziert und mittels Na^+/H^+ -Austauscher der Einstrom von Natriumionen in das Zytosol aktiviert bzw. gesteigert (8). Da eine intrazelluläre Azidose die myofibrillären Prozesse, resultierend in der Hyperkontraktur der Zelle, inhibiert, ist die Nivellierung des pH-Wertes nicht unproblematisch. Der protektive Effekt auf die Kardiomyozyten - weiterleitend auf das Myokard - wird also gleich wieder beseitigt. Der gesteigerte Natriumioneneinstrom verursacht eine Natriumionenüberladung, was zu einer sekundären Aktivierung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers führt. Dieser läuft dann im

„Rückwärtsmodus“ ab: Calciumionen werden in die Zelle hinein und Natriumionen aus der Zelle transportiert. Die Calciumüberladung wird also zusätzlich verstärkt, was bedeutet, dass die schnelle Aufhebung der Azidose und die damit verknüpfte sekundäre Calciumaufnahme die Entwicklung der Hyperkontraktur und die Schädigung des Myokards verstärken.

c) Normalisierung der Gewebeosmolarität

In den, nach einer Ischämie, reperfundierten Kardiomyozyten kommt es zu einem Wassereinstrom. Dieser wird unter anderem durch eine Überladung des Zytosols mit Natriumionen verursacht. In den ischämischen Kardiomyozyten akkumulieren die Endprodukte des anaeroben Metabolismus, welche osmotisch aktiv sind. Während der Reperfusion wird der Überschuss von osmotisch aktiven Molekülen im extrazellulären Bereich ausgewaschen und es entsteht ein osmotischer Gradient zwischen dem intra- und extrazellulären Raum. Um diesen auszugleichen, kommt es zur zellulären Wasseraufnahme und somit zu einem Anstieg des intrazellulären Drucks sowie zur Ausdehnung der Sarcolemma. Die Kardiomyozyten schwellen an. Eine Kombination mit weiteren Stressfaktoren wie Energieentzug und Hyperkontraktur erhöht das Risiko einer Zellschädigung und bewirkt den Untergang des Myokards.

Die Entstehung der mPTPs wird als finaler Schritt des Reperfusionsschadens angesehen (9). Diese Pore wirkt wie ein Verbindungstunnel zwischen der mitochondrialen Matrix und dem Zytosol der Kardiomyozyten. Aufgrund der ischämischen Schädigungen, der Calciumionenüberladung und des oxidativen Stresses kommt es in den ersten min der Reperfusion zur Entstehung der mPTPs. Die Entstehung und Öffnung der mPTP verursacht einen Kollaps des mitochondrialen Membranpotentials Ψ_m , wodurch die ATP-Produktion der Zellen gehemmt wird. Der Energieverlust führt zum Aussetzen der Na^+/K^+ -ATPasen, was eine intrazellulären Akkumulation von Natriumionen bewirkt. Der entstehende osmotische Druck bedingt Wassereinstrom und führt zum Verlust der Volumenregulation. Das Anschwellen der Mitochondrien beschädigt deren äußere Membran und es kommt zur Freisetzung des Apoptoseindikators Cytochrom C. Infolge des Unterganges von Zellmitochondrien, durch die Ausbildung und Öffnung der mPTPs, kann es vorkommen, dass die Zellen zunächst von der Reperfusion profitieren, aber später durch eine vom Cytochrom C ausgelöste Apoptose zu Grunde gehen (3).

1.1.3 Ischämische Prä- und Postkonditionierung (IPC und Ipost)

Die ischämische Prä- und Postkondition sind endogene kardioprotektive Strategie, die zur Steigerung der Widerstandskraft bei einem akuten Herzinfarkt und der darauffolgenden

Reperfusion dient. Es werden verschiedene Mechanismen, wie endoge Mediatoren oder kardioprotektive Proteine diskutiert. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit nach der pharmakologischen Konditionierung (10).

Bei der ischämischen Präkonditionierung handelt es sich um kurze, wiederholte Episoden von Ischämie und Reperfusion direkt vor dem eigentlichen ischämischen Ereignis (Abb.1.5). Dieses wurde zuerst durch Murry et al. im Jahre 1986 entdeckt und löste eine intensive Forschung in diesem Bereich aus. Isolierte Herzen wurden vor der lang andauernden Ischämie, der Indexischämie, einigen kurzen Intervallen von Ischämie und Reperfusion ausgesetzt. Vier Zyklen von je fünf min Koronarverschluss und fünf min Reperfusion vor der 40 min andauernden Indexischämie reduzierten die Infarktgröße von Hundeherzen signifikant (11).

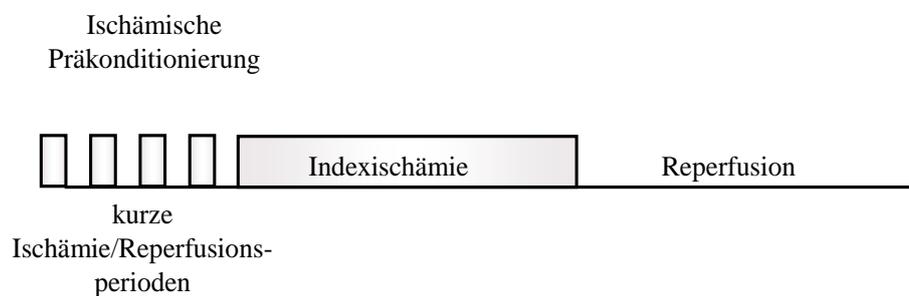


Abb. 1.5: Ischämische Präkonditionierung. Die ischämische Präkonditionierung findet in Form von kurzen alternierenden Episoden von Ischämie und Reperfusion statt, welchen eine lange Indexischämie von 40 min folgt. Nach der Indexischämie wird die Reperfusion eingeleitet.

Die ischämische Präkonditionierung kann in zwei Phasen unterteilt werden: die Initialisierung (oder Auslöserphase) und die Mediator- bzw. Vermittlungsphase. Die Auslöserphase wird vor der Indexischämie aktiviert. Die Vermittlungsphase tritt während der Ischämie und der darauf folgenden Reperfusion auf.

Die umfangreiche Aufklärung dieses Phänomens ist noch Gegenstand laufender Forschung. Bekannt ist, dass die kurzen Zyklen der Präkonditionierung die Freisetzung von verschiedenen endogenen Stoffen wie z.B. Adenosin, Bradykinin und Opioide aus dem ischämischen myokardialen Gewebe verursachen. Diese agonistisch wirkenden Substanzen binden an G_i-Protein gekoppelte Rezeptoren (G_iPCR) auf der Zelloberfläche der Kardiomyozyten. Alle drei Substanzen wirken parallel und aktivieren intrazelluläre Signaltransduktionswege was zum Schutz des Herzens nach einem MI führt. Die drei endogenen Auslöser der ischämischen Präkonditionierung aktivieren unterschiedliche intrazelluläre Kaskaden. Alle drei Signalwege laufen bei der PKC wieder zusammen (Abb. 1.6.).

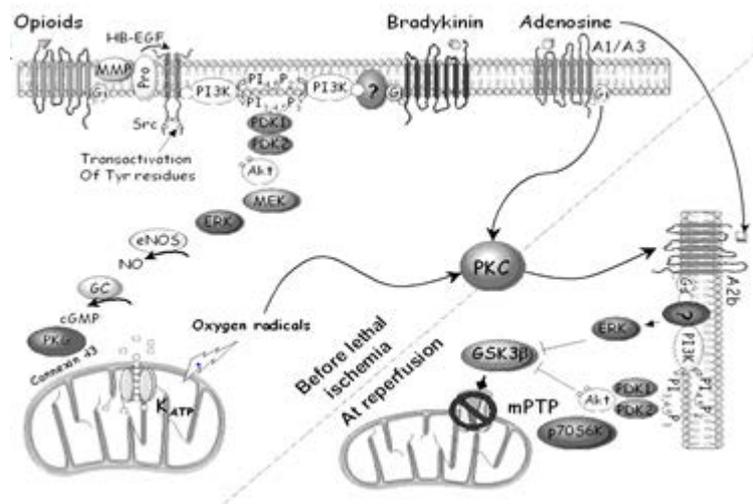


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des Signalweges der Präkonditionierung. Während der ischämischen Präkonditionierung werden Mediatoren wie Adenosin, Bradykinin und Opiode freigesetzt, die eine Aktivierung von PKC bewirken. Während der Reperfusion wird durch die Aktivierung verschiedener Kinasen die Formation der mPTP inhibiert (nach Cohen et al. (12)).

Die spezielle Wirkung der Opiode wird über Matrix-Metalloproteinasen und über den EGFR, den epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor, vermittelt. Opiode binden zuerst an ihren G_i -Protein gekoppelten Rezeptor und transaktivieren EGFR. Diese Transaktivierung erfolgt über Matrix-Metalloproteinasen, welche den Heparin binding-EGF-like growth factor (HB-EGF) von seiner membrangebundenen Form abspalten. HB-EGF bindet an den EGFR und bewirkt eine Dimerisierung mit nachfolgender Steigerung der Autophosphorylierungsaktivität des EGFR. Neben der Autophosphorylierung erfolgt die Bindung der Src-Kinase. Diese rekrutiert und aktiviert die PI3-Kinase, welche selbst verschiedene Zielstrukturen über phosphatidylabhängige Kinasen (PDK) aktiviert. Der Einbezug der PI3-Kinase in den Signaltransduktionsweg der Präkonditionierung wurde erstmals von Tong et al. (13) nachgewiesen. Eine besonders relevante Zielstruktur der PI3-Kinase stellt Akt dar, welche phosphoryliert und damit aktiviert wird. Akt stimuliert daraufhin die endotheliale NO-Synthase, welche die NO-Produktion steigert. NO ist in diesem Zusammenhang einer der wichtigsten sekundären Botenstoffe. Als Aktivator der Guanylat-Zyklase, die aus GTP cGMP bildet, kommt NO zusammen mit cGMP eine fundamentale Bedeutung in der Kardioprotektion durch Konditionierung zu. Oldenburg et al. zeigten die faszinierende Bedeutung der Guanylat-Zyklase (14). Sie fanden heraus, dass spezifische Inhibitoren der Guanylat-Zyklase den protektiven Effekt der Präkonditionierung aufheben. cGMP agiert in vielen Signaltransduktionswegen, sowohl im vitalen, als auch im beschädigten Myokard, als sekundärer Botenstoff.

Wenn die Guanylat-Zyklase aktiv ist, akkumuliert cGMP intrazellulär und interagiert mit verschiedenen Zielstrukturen, u. a. mit der cGMP-abhängigen Proteinkinase PKG. Qin et al.

haben 2004 nachgewiesen, dass die direkte PKG-Aktivierung durch ein zellpermeables cGMP-Analogon schützend wirkt (15). Die Annahme, dass cGMP und PKG in dem protektiven Weg zwei Hauptrollen zukommen, ist nahezu zwingend. Über die PKG wird die Öffnung der mitochondrialen adenosintri-phosphatabhängigen Kaliumkanäle (mK_{ATP} -Kanäle) stimuliert, was für die Vermittlung des kardioprotektiven Signals vom Zytosol in die Mitochondrien verantwortlich ist. Die entscheidende Rolle der mK_{ATP} -Kanäle konnte Salloum et al. (16) nachweisen. Das Öffnen dieser Pore verursacht einen Einstrom von Kaliumionen, was zu einer Schwellung der Mitochondrien, aufgrund des entstehenden osmotischen Gradienten, führt. Diese Schwellung regt die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) an. Baines et al. und Tritto et al. stellten fest, dass ROS-Radikalfänger diesen Schutz blockieren können (17, 18). Eine wichtige Zielstruktur von ROS stellt die Proteinkinase C (PKC) dar. Die PKC fungiert als das Gedächtnis des Schutzes sorgt dafür, dass der Schutz auch dann noch anhält, wenn endogene Auslöser ausgewaschen wurden (19).

Bradykinin wirkt in vergleichbarer Weise wie die Opiode, allerdings ohne Beteiligung des EGFR (14, 20). Die PI3-Kinase wird dabei über einen anderen, noch nicht vollständig geklärten, Weg aktiviert.

Adenosin aktiviert die PKC direkt und spart sowohl die PI3-Kinase als auch die ROS-Produktion aus (21). Die PKC triggert während der Reperfusion den Adenosin Rezeptor Subtyp A2b. Die Aktivierung potentiell protektiver Kinasen ist die Folge (22). So wird GSK-3 β , eine konstitutiv aktive Kinase, durch Phosphorylierung inaktiviert. Diese Inaktivierung von GSK-3 β wirkt kardioprotektiv, da sie die Bildung von mPTPs in den Mitochondrien der Kardiomyozyten hemmt (23). Auch eine direkte Phosphorylierung der GSK-3 β durch die PKC konnte bereits gezeigt werden.

Das kardioprotektive Potential der Präkonditionierung hat klinisch naturgemäß kaum Relevanz, da erst der akute MI Auslöser für die Hospitalisierung des Patienten ist. Deshalb können Rettungskräfte bzw. Kliniker meist erst während der Ischämie bzw. der Reperfusion helfend eingreifen. Somit ist es von elementarer Bedeutung, Ansatzpunkte zu finden, um schützend bzw. rettend in der Reperfusion einzugreifen.

Die Intervention zum Schutz des Herzmuskelgewebes direkt nach der Ischämie wird ischämische Postkonditionierung (IPO) genannt. Alternierende koronare Verschlüsse, wie bei der Präkonditionierung, allerdings zu Beginn der Reperfusion, wirken ebenfalls schützend auf das Herz (Abb. 1.7). Zhao et al. konnten darstellen, dass sich die Infarktgröße erheblich verkleinert, wenn Hundeherzen mit drei Zyklen von 30 sek Reperfusion und 30 sek Ischämie

am Ende der Indexischämie postkonditioniert werden. Die Postkonditionierung liefert also einen kardioprotektiven Effekt, der quantitativ analog der ischämischen Präkonditionierung ist.

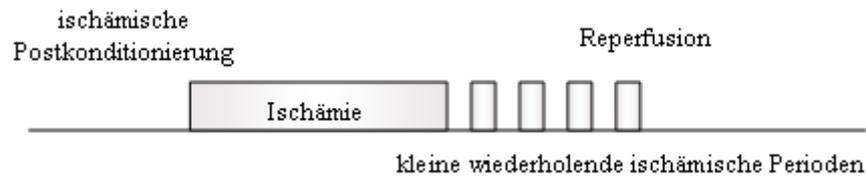


Abb. 1.7: Ischämische Postkonditionierung. Der Indexischämie folgen kurze zyklische Ischämie- und Reperusionsperioden. Die ischämische Postkonditionierung ist klinisch sehr relevant und bewirkt genau wie die ischämische Präkonditionierung einen Schutz der Kardiomyozyten vor einem Ischämie- und Reperusionschaden.

Die Theorie, dass Signalmoleküle und Botenstoffe, die in der Präkonditionierung involviert sind, auch in der Postkonditionierung von entscheidender Bedeutung sind, konnte durch zahlreiche Studien gezeigt werden (24, 25). Bekannt ist, dass auch während der Postkonditionierung final das Entstehen der mPTPs gehemmt wird. Darüber hinaus belegen diverse Arbeiten, dass entscheidende Mediatoren der kardioprotektiven Signalkaskade wie die PKC, Adenosinrezeptoren, PI3-Kinase, Guanylat-Zyklase, ERK und mK_{ATP} -Kanäle analog der Präkonditionierung, involviert sind (26–29).

Ungeachtet der absoluten Klärung der intrazellulär ablaufenden Signalkaskade zum Schutz, besteht die Möglichkeit, das Protokoll der Postkonditionierung am Herzen im Gegensatz zur Präkonditionierung im Klinikalltag einzusetzen.

1.1.4 Pharmakologische Prä- und Postkonditionierung

Im Zuge der Forschung, die IPC und IPO zu verstehen und deren intrazellulären protektiven Signalwege klar darzustellen, kristallisierten sich Enzyme heraus, die das protektive Signal weiterleiten bzw. stoppen. Ebenso gut können diese Enzyme pharmakologisch getriggert werden. Die Erkenntnisse, zielspezifische Pharmaka einzusetzen, führten zur pharmakologischen Konditionierung, welche quantitativ einen entsprechenden Schutz bewirkt. Wird ein entsprechendes Pharmakon vor der Indexischämie koronar infundiert, nennt man den Prozess pharmakologische Präkonditionierung. Im Umkehrschluss wird für die pharmakologische Postkonditionierung das Pharmakon nach der Indexischämie eingesetzt (Abb. 1.8).

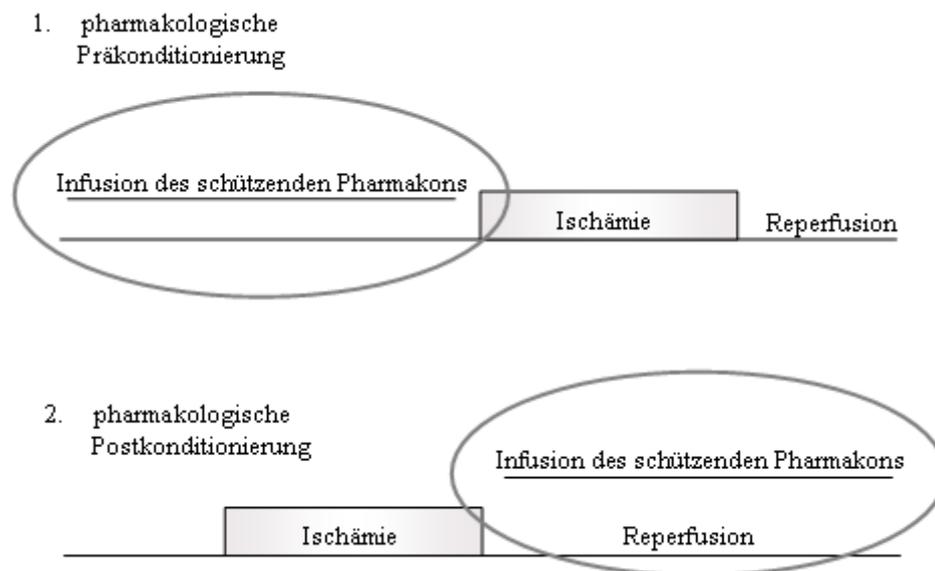


Abb. 1.8: Pharmakologische Prä- und Postkonditionierung. Die Infusion eines schützenden Pharmakons vor der Ischämie wird als pharmakologische Präkonditionierung bezeichnet (1.). Die Infusion des schützenden Pharmakons nach der Ischämie nennt man pharmakologische Postkonditionierung (2.).

So wurden verschiedene pharmakologische Agentien identifiziert, welche nachweislich die Infarktgröße reduzieren konnten, wenn diese während der frühen Reperfusion verabreicht wurden. Dieser Gruppe an Substanzen zugehörig sind Insulin, transforming growth factor- β (TGF- β), der Adenosin-Agonist 5'-N-ethylcarboxamido Adenosin (NECA) (30), GSK-3 β -Inhibitoren (31), Bradykinin (30) und sogar PDE-Inhibitoren wie z.B. Vardenafil (32).

1.2 Lösliche Guanylat-Zyklase (sGC) während der Postkonditionierung

Von der Guanylat-Zyklase (GC) werden zwei Isoformen gebildet. Zum einen die partikuläre Guanylat-Zyklase (pGC), welche durch natriuretische Peptide wie ANP, BNP und CNP aktiviert wird, zum anderen lösliche Guanylat-Zyklase, welche durch Stickstoffmonoxid (NO) aktiviert wird. Die löslichen Guanylat-Zyklasen liegen in ihrer katalytisch aktiven Form als Heterodimer aus einer α - und einer β -Untereinheit vor. Insgesamt konnten vier sGC-Gene identifiziert werden (α_1 , α_2 , β_1 , β_2). Diese variieren in ihrem Molekulargewicht je nach Spezies und Isoform. Für die Bildung eines funktionstüchtigen Heterodimers mit katalytischen Eigenschaften ist eine Co-Expression beider Untereinheiten zwingend erforderlich. Die sGC besitzen im Gegensatz zu den pGCs und den Adenylatzyklen (AC) eine prosthetische Hämgruppe, welche für die Aktivierung des Enzyms durch NO verantwortlich ist. Der physiologische Aktivator der sGC ist das NO. NO wird im Organismus von insgesamt drei Isoformen der NO-Synthasen (nNOS, iNOS, eNOS) als Produkt der enzymatischen Konversion

von L-Arginin zu Citrullin gebildet. Der Mechanismus der sGC-Aktivierung durch NO ist bis heute nicht abschließend geklärt. NO bindet direkt am zentralen Eisenatom der prosthetischen Häm-Gruppe, wodurch es schließlich zur Lösung der Bindung des Häms vom Histidin₁₀₅ der β -Untereinheit der sGC kommt.

Der in den Zellen durch die verschiedenen GC gebildete „second messenger“ cGMP ist, je nach Gewebe, an der Regulation einer Vielzahl unterschiedlicher physiologischer Prozesse beteiligt. Diese Vielzahl von Funktionen durch einen Botenstoff wird durch die unterschiedliche Ausstattung der Gewebe mit verschiedenen cGMP-Effektorsystemen möglich. Die Effektorsysteme, die maßgeblich durch den zellulären cGMP-Spiegel beeinflusst werden, lassen sich in drei Klassen einteilen: die cGMP-regulierten Phosphodiesterasen (PDE), die durch cGMP gesteuerten Ionenkanäle (CNG-Kanäle) und die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKG).

Die PDE sind in den Zellen die natürlichen Gegenspieler der verschiedenen AC und GC und sorgen für einen stetigen Abbau der gebildeten zyklischen Nukleotide. Die beiden maßgeblich am cGMP-Abbau beteiligten PDE sind die für cGMP spezifischen PDE-5 und PDE-9, während die PDE-1, 2, 3, 10 und 11 sowohl cGMP als auch cAMP als Substrat akzeptieren (33).

Die vom zyklischen Nukleotid abhängigen Ionenkanäle sind größtenteils an der Signaltransduktion von Umweltreizen in den primären Sinnesneuronen des Riech- und Geschmacksepithels sowie der Retina beteiligt und demzufolge stärker in diesen Geweben exprimiert. Nach ihrer Aktivierung durch intrazelluläres cAMP bzw. cGMP ermöglichen diese Ionenkanäle einen Einstrom von Na⁺ und vor allem Ca²⁺ in die Zelle, das wiederum als „third messenger“ weitere Signalkaskaden in Gang setzt.

Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKG) gehören zur Familie der Serin-Threonin-Kinasen und werden verstärkt in Thrombozyten, glatten Muskelzellen und Herzmuskelzellen exprimiert. In verschiedenen Studien konnte die wichtige Rolle des NO – sGC – cGMP - PKG Signaltransduktionsweges in der Prä- und Postkonditionierung des Herzens nach Myokardinfarkt gezeigt werden (32, 34–36). Die Aktivierung einzelner Komponenten dieses Signalweges führt zum Schutz des Herzens vor einem Ischämie/Reperfusionsschaden, sofern diese Modulatoren während der frühen Reperfusion verabreicht werden. Diese Komponenten schließen sowohl cGMP Analoga als auch Substanzen, die dafür bekannt sind, cGMP zu erhöhen (wie z.B. PDE-5 Inhibitoren) mit ein. So konnte unter anderem in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass der PDE-5 Inhibitor Vardenafil den Ischämie/Reperfusionsschaden verringert, wenn dieser in der frühen Phase der Reperfusion isolierten Rattenherzen verabreicht wurde (32).

Die Untersuchung der Wirkung von NO-Donoren, zur Aktivierung von sGC, stellte eine große Herausforderung dar, da NO an vielen anderen Mechanismen beteiligt ist und somit eine direkte Aktivierung von sGC nahezu unmöglich macht. Deshalb trat in den letzten zehn Jahren die direkte Aktivierung der sGC während der Reperfusion in den Mittelpunkt der Untersuchungen. Hierfür standen sGC Aktivatoren und Stimulatoren zur Verfügung (Abb. 1.9). sGC Aktivatoren unterscheiden sich von sGC Stimulatoren im Bindungsverhalten. Die sGC Aktivatoren binden an die oxidierte und hämfreie Form der sGC. Die sGC Stimulatoren binden an die nicht oxidierte Hämgruppe enthaltene Form der sGC. Sowohl sGC Aktivatoren, als auch Stimulatoren, lösen zwar eine NO-unabhängige cGMP Produktion aus, jedoch wird die Auslösung verstärkt, wenn NO vorhanden ist.

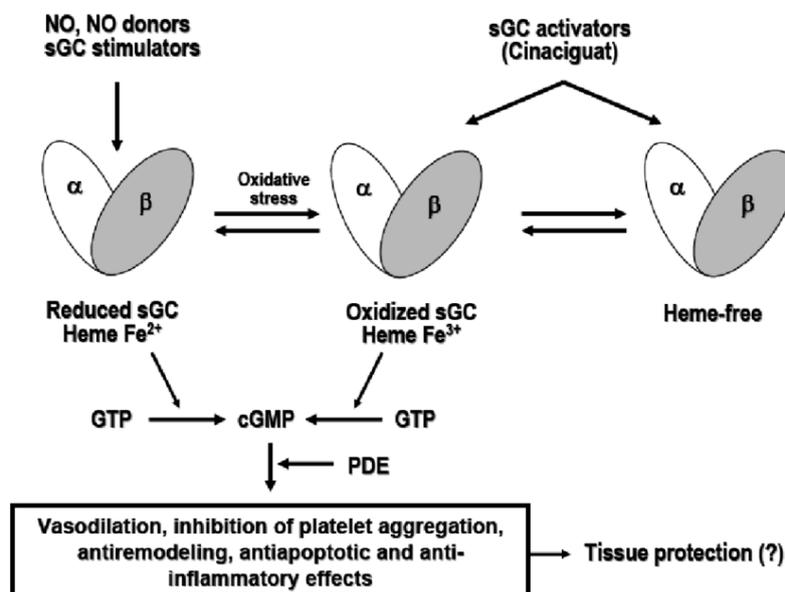


Abb. 1.9: Schematische Darstellung der NO-unabhängigen Wirkungsweise von sGC Aktivatoren und Stimulatoren. sGC Stimulatoren aktivieren sGC direkt durch Bindung an die reduzierte Form des Enzyms, während sGC Aktivatoren an die oxidierte, hämfreie Form binden. NO: nitric oxid, cGMP cyclic guanosine monophosphat, GTP: guanosine 5'-triphosphat, PDE: Phosphodiesterase, sGC: lösliche Guanylatzyklase (37).

Der in dieser Arbeit untersuchte NO- und Häm-unabhängige sGC-Aktivator, BAY 58-2667 (Abb. 1.10), aktiviert die sGC.

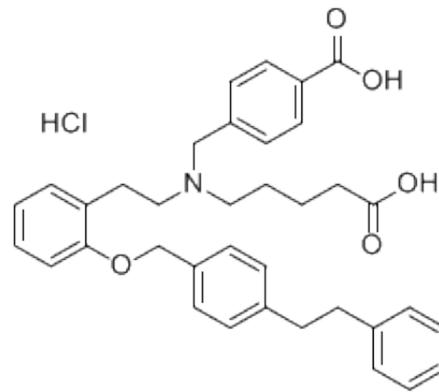


Abb. 1.10: Struktur von BAY 58-2667. Potenter, Stickstoffmonoxid-(NO)-unabhängiger, löslicher Guanylatcyclase-(sGC)-Aktivator mit hämodynamischer Wirkung ähnlich der von Nitroglycerin (K_i -Wert 6-8 nM in Wettbewerbsbindungsstudien). Wirkt spezifisch auf oxidierte/häm-freie sGC, indem es an die Häm-Tasche des Enzyms bindet und die stickstoffoxidgebundene Häm-Gruppe nachahmt.

BAY 58-2667 wird derzeit klinisch untersucht. Noch ist nicht bekannt, ob BAY 58-2667 als kardioprotektiv im Rahmen der Ischämie/Reperfusion wirkt.

1.3 cAMP und cGMP Transporter ABCC 4 und 5 im Herzen

Bei der Regulation verschiedenster physiologischer Prozesse kommt den sekundären Botenstoffen cAMP und cGMP eine Schlüsselrolle zu, wie z.B. bei der Relaxation vaskulärer und nicht-vaskulärer weicher Muskeln, der Natriurese, der Zellproliferation, der Thrombozytenfunktion, der Spermienbeweglichkeit und der Sekretion von Ionen (38–40).

Wie bereits zuvor erwähnt, bewirken cAMP und cGMP ihre biologischen Effekte durch die Aktivierung der Proteinkinase A und G (PKA und PKG), sowie zyklischer Nukleotid-abhängiger Ionenkanäle und der Aktivierung oder Hemmung der PDE (41).

Die intrazelluläre Konzentration von cAMP und cGMP wird durch drei Mechanismen entscheidend reguliert. Wie in den Kapiteln zuvor angeführt, steht die intrazelluläre Konzentration in Abhängigkeit von der Aktivierung der AC, der sGC oder der pGC. Des Weiteren reguliert die Hydrolyse der zyklischen Nukleotide durch die Phosphodiesterasen (PDE) den intrazellulären Spiegel der zyklischen Nukleotidmonophosphate (cNMP). Der dritte Mechanismus zur Regulation von intrazellulären cAMP und cGMP Level ist nicht-enzymatisch und wird durch membranständige Transporter vermittelt.

Die ATP-binding-Cassette-(ABC)-Proteine bilden eine große Superfamilie von Transmembranproteinen. Sie nutzen die Energie der ATP-Hydrolyse, um ihre Substrate durch biologische Membranen zu schleusen. Die ABC-Familie ist sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten bekannt. In Eukaryonten kodieren ABC-Gene typischerweise vier Domänen, die aus zwei ATP-Bindungssegmenten und zwei Transmembrandomänen bestehen (Abb. 1.11).

Ein wichtiges Erkennungsmerkmal der Transporter sind bestimmte Aminosäuresequenzen in der Nukleotidbindungsregion.

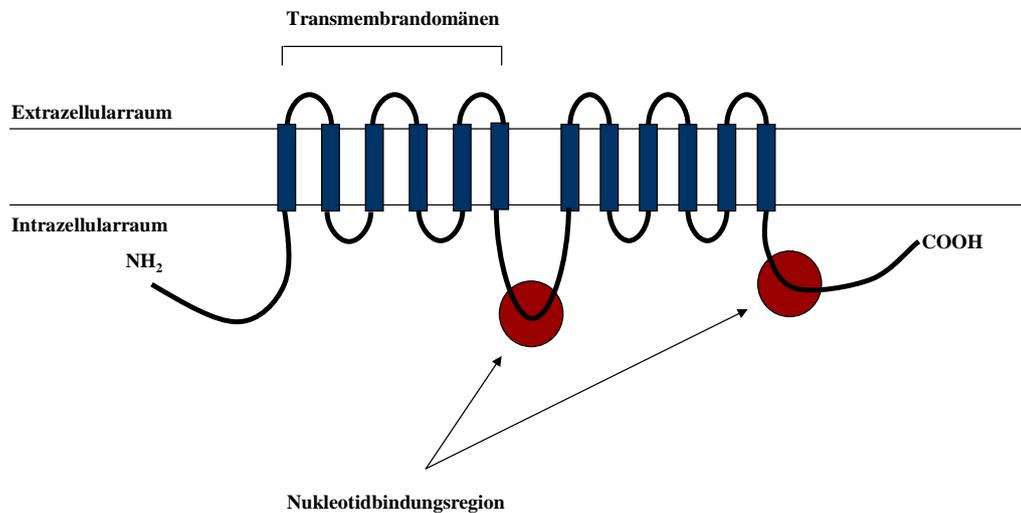


Abb. 1.11: Schematische Darstellung des Aufbaus der Multidrug Resistance Proteine 4 und 5 [MRP 4/5/ABCC 4/5]. Verändert nach G.L. Scheffer (42).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 2 Transporter, die am zellulären Export sowohl endogener als auch exogener Substanzen beteiligt sind, und damit durch eliminierende Fähigkeiten von Bedeutung erscheinen, aus der großen ABC-Superfamilie zur weiteren Charakterisierung ausgewählt: ABCC 4 und 5. ABCC 4/5 beeinflussen die intrazelluläre Signaltransduktion durch den Transport von zyklischen Nucleotiden und sind somit von besonderem Interesse im Herzen. ABCC 4/5 sind Mitglieder der Multidrug Resistenz Protein (MRP)-Subfamilie der ABC-Transporter, die in der Zellmembran lokalisiert sind. Die Subtypen ABCC 4 und ABCC 5 werden als Haupttransporter erachtet, die dafür verantwortlich sind, Level zyklischer Nucleotide zu regulieren. Obwohl beide Subtypen eine Affinität für cAMP und cGMP haben, hat sich die Mehrheit der Forschung auf die Rolle von ABCC 4 als Transporter von natürlich auftretenden Metaboliten konzentriert. Hierfür wären als Beispiele Glutathion, Sulfatkonjugate und Prostanoiden genauso, wie antivirale und antineoplastische Agentien anzuführen. Die Ausschleusung von zyklischen Nucleotiden durch ABCC 4 wurde in Gefäßen und in Blutzellen, wie den Erythrozyten und Plättchen, festgestellt (43). ABCC 4 wird unter anderem auch in Kardiomyozyten exprimiert. Hier konnte die Rolle von ABCC 4 als Transporter von cAMP hinsichtlich der Entwicklung von Hypertrophie im Herzen und Fibrose gezeigt werden (44).

ABCC 5 hat eine besonders hohe Affinität zu cGMP und eine geringe Affinität zu cAMP (45). Dieses endogene Substrat, welches als intrazellulärer Botenstoff verschiedener Signalwege

wirkt, macht ABCC 5 zu einem interessanten Transporter im Zusammenhang mit einem Organ wie dem Herz, welches nachweislich durch cGMP während der Ischämie/ Reperfusion protektiert wird. ABCC 5 wird in verschiedenen Geweben exprimiert (46, 47), darunter auch in Erythrozyten und in Kardiomyozyten (43, 48). Eine Inhibitionsstudie ergab die Hemmung der ABCC 5-Transportvorgänge durch Substanzen wie Probenecid, Fluoresceindiacetat, Trequensin, Sildenafil, Zaprinast und cGMP-Analoga (45). Der intrazelluläre cGMP-Spiegel wird sowohl durch die Syntheserate der Guanylatzyklase als auch durch die Rate der Elimination bestimmt. Zusätzlich zum Abbau von cGMP durch die Phosphodiesterase 5 hat der aktive Transport von cGMP aus der Zelle Einfluss auf diese Elimination, wie in Abbildung 1.12 graphisch dargestellt.

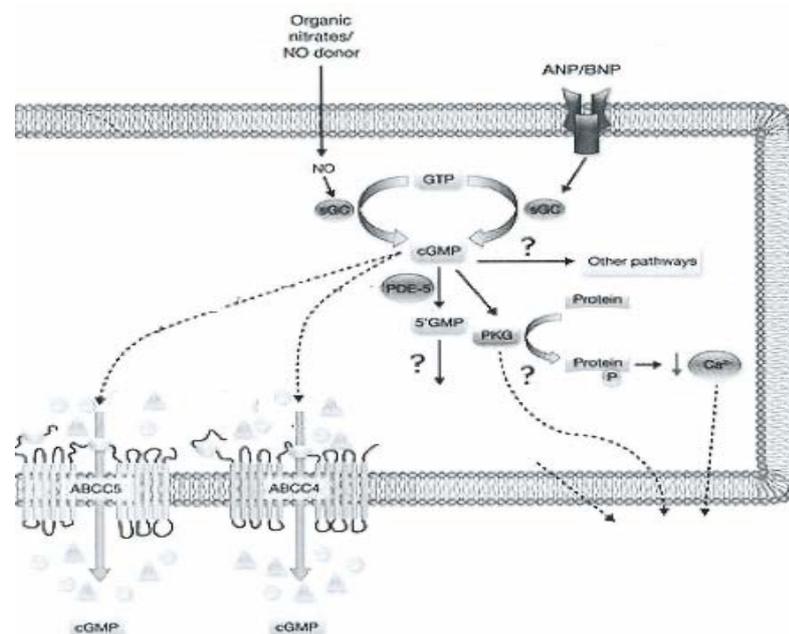


Abb. 1.12: Schematische Darstellung der Rolle von ABCC 4 und ABCC 5 in der intrazellulären cGMP-Regulation. Der intrazelluläre cGMP-Spiegel wird sowohl durch die Syntheserate der Guanylatzyklase als auch durch die Rate der Elimination bestimmt. Zusätzlich zum Abbau von cGMP durch die Phosphodiesterase 5 hat der aktive Transport von cGMP aus der Zelle Einfluss auf diese Elimination. Verändert nach Cancer Research Reviews (49).

Zusätzlich konnte der Transport der Chemotherapeutika 6-Mercaptopurin und Thioguanin nachgewiesen werden. Es wird angenommen, dass diese beiden Substanzen intrazellulär metabolisiert werden und dann ABCC5 als Substrat dienen. Als Substrate wurden außerdem Cytarabin, Gemcitabin, Cladribin und diverse Strukturanaloga identifiziert (50, 51). Weiterhin gibt es Studien über ABCC 5 und dessen Beteiligung an Arzneimittelresistenzen. M. Yoshida et al. konnten zeigen, dass die Transkription von ABCC 5 durch Doxorubicin induziert wird. Dieser Effekt findet sich erst einige Stunden nach Exposition, was darauf hindeutet, dass es sich bei ABCC 5 nicht um ein Stress-response-Gen handelt.

Die genaue Funktion von ABCC 5 in diesem in vitro-Modell bleibt jedoch offen (52). ABCC 4 und ABCC 5 wurden ausgewählt, da deren Einfluss auf die intrazelluläre Signaltransduktion durch den Transport von zyklischen Nukleotiden aus den Zellen im Herz während der Ischämie/Reperfusion von besonderem Interesse ist und während der Postkondition von Bedeutung sein könnte. Auch durch ihre eliminierenden Fähigkeiten könnten diese Transporter im Herzen von Bedeutung sein, der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht bekannt.

1.4 Aufgabenstellung

Diese Arbeit befasst sich mit der Rolle des sekundären Botenstoffes cGMP in der Kardioprotektion während der Ischämie/Reperfusion. Hierfür wurde modulierend auf alle maßgeblichen Mechanismen der Regulation der intrazellulären Spiegel der zyklischen Nukleotidmonophosphate cAMP und cGMP wie die Bildung, den Abbau und den transmembranen Effluxtransport eingewirkt.

Mit Hilfe des Modells isolierter Rattenherzen, das durch Verschluss und Wiederöffnung der linken Koronararterie einen akuten Myokardinfarkt stimuliert, wurden potentielle schützende Effekte des sGC Aktivators BAY 58-2667 untersucht. In den ersten Experimenten wurde getestet, welche Konzentration von BAY 58-2667 in isolierten Rattenherzen kardioprotektiv wirken könnte. Des Weiteren sollten im Rahmen dieser Arbeit mögliche Signaltransduktionswege, vermittelt durch BAY 58-2667, geprüft werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von ABCC 4 und ABCC 5, welche zyklische Nukleotide transportieren, zu untersuchen. Die Regulation von endogenen Substraten und der mögliche Eingriff in physiologische Regulationsmechanismen im Herzen bildeten die Basis für die Charakterisierung von ABCC 4 und ABCC 5. Die Transporter werden bezüglich ihrer Expression und Lokalisation im Herzen untersucht. Hierzu werden neben Rattenherzgewebe auch kardiale Zelllinien und adulte Rattenkardiomyozyten untersucht und das Expressionsniveau auf mRNA-Ebene bzw. Protein-Ebene dargestellt. Mittels viraler Transfektion soll die Transporterexpression moduliert werden und Rückschlüsse auf die regulierende Relevanz für den intrazellulären Spiegel der zyklischen Nukleotide liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die verwendeten Chemikalien wurden über die Universitätsapotheke Greifswald bezogen und sind mit den jeweiligen Herstellern aufgeführt.

2.1.1 Allgemein verwendete Chemikalien, Gase, Enzyme und Medien

Hersteller	Chemikalien, Gase, Enzyme und Medien
<i>AGFA, Belgien</i>	DEVELOPER G153 A und B RAPID FIXER G153
<i>Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland</i>	Carbogen (95 % O ₂ , 5 % CO ₂)
<i>Ambion, Kanada Amersham Biosciences, England</i>	Agarose ultra pure (RNA) ECL TM Western Blotting Detection Reagents Immobiline TM Dry Strips Rainbow-Marker
<i>Applied Biosystems, Weiterstadt</i>	Endogenous 18S Ribosomal RNA Control TaqMan [®] RT Kit
<i>ApplieChem, Darmstadt</i>	Glycerin 87 % Silbernitrat
<i>Altana Pharma Deutschland GmbH, Konstanz, Deutschland Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland Braun, Melsungen</i>	Thiopental-Natrium (<i>Trapanal</i> [®] , 0,5 g/20 ml Durchstechflasche) BAY 56-2887
<i>DakoCytomation, Hamburg Diagnostics Chem. Limited, Kanada</i>	Aqua ad injectabilia Heparin-Natrium (25.000 I.E./5 ml) TOTO Dithiotreitol
<i>Duke Scientific Corp., Palo Alto, CA, USA GIBCO Invitrogen, Niederlande</i>	Fluorescent Polymer Microspheres (Diam. 3-8#m), 1 g Agarose ultra pure für 2D-Gele M199-Medium DMEM-Medium
<i>IBL-Transatlantic Corp., Toronto, Canada. Invitrogen, Karlsruhe</i>	RIA KIT dNTPs (10 mM) Magnesiumchlorid (25 mM) Medium DMEM high glucose with Glutamax [®]
<i>J. T. Baker, Deventer, Holland</i>	Aceton Methanol

Hersteller	Chemikalien, Gase, Enzyme und Medien
<i>Leinco Technologies, USA MERCK, Darmstadt</i>	Anti-HLA,B,C-Purified-Antibodies Anti-HLA-DR-Purified-Antibodies Calciumchlorid Dinatriumhydrogenphosphat Ethanol Harnstoff Natriumacetat Natriumcarbonat Natriumdihydrogenphosphat Wasser für Chromatographie
<i>Millipore, Eschborn</i>	Agarose (DNA-Gel) PVDF- Membran
<i>Molecular Probes, USA</i>	Alexa Fluor 488 anti-mouse Alexa Fluor 568 anti-mouse Alexa Fluor 488 anti-rabbit Alexa Fluor 568 anti-rabbit
<i>New England Biolab, Frankfurt am Main</i>	AcI I Ban II BbsI BsrD I NewEngland Puffersysteme (NEBuffer 2-4) Tse I
<i>OxfordGlycoSystems, England PAA Laboratories PAA, Pasching Peqlab, Erlangen Pierce, Rockford, USA Promega, Madison WI, USA</i>	Bromphenolblau Hygromycin Bovines Serumalbumin (BSA) Peqlab RNA Gold Pure LumiPhos™ FuGENE®HD Transfection Reagent Ligase T4 pGEM-T Easy Vektor
<i>Hoefer Pharmacia Biotech, USA</i>	Tetramethylethylenediamid (TEMED) Dry Strip Cover Fluid
<i>Qiagen, Hilden</i>	RNeasy Mini Kit PCR purification Kit Tissue DNA Extraction Kit
<i>Roche Diagnostics, Mannheim</i>	DNaseI
<i>Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe</i>	Rinderserumalbumin (BSA) β-Mercaptoethanol Bromphenolblau Calciumchlorid Dimethylsulfoxid Ethanol Glucose Glycerol Glycin 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)- Ethansulfonsäure (HEPES) Kaliumchlorid Natriumchlorid Natriumdodecylsulfat (SDS)

Hersteller	Chemikalien, Gase, Enzyme und Medien
<i>Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe</i>	Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)
	Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)
	Natriumthiosulfat Pentahydrat
	Pefabloc
	2-Propanol
	SodiumDodecylSulfat (SDS)
	Trishydroxymethylaminmethan (Tris)
<i>SAFC Bioscience; Lenaxa, USA</i>	Claycomb-Medium
<i>Schärfe System, Reutlingen</i>	CASY®ton
<i>Seromed-Biochrom KG, Berlin</i>	Amphotericin B
	Kollagenase Typ II
	Fetales Kälberserum (FCS)
	10 x Hank's balanced salt solution (HBSS)
	L-Glutamin
	Medium 199 Earle
	Medium RPMI 1640
	Penicillin/Streptomycin
	Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)
	Trypanblau
	Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %)
	Trypsin
<i>SERVA, Heidelberg</i>	Agarose
	Triton-X 100
<i>Sigma, Taufkirchen</i>	Ammoniumpersulfat (APS)
	Bicinchoninsäure
	CHAPS
	Chloroform
	Dimethylformamid
	Doxorubicinhydrochlorid
	EDTA
	Epidermal Growth factor (EGF)
	Ethidiumbromid
	Fibroblast growth factor (FGF)
	Formaldehyd, 37 %
	Formaldehyd, 70 %
	Hepes
	Heparin
	Hydrocortison
	Iodoacetamid
	IPTG
	Isopropanol
	Kaliumchlorid
	Kupfer-II-sulfat
	KT-5823
	Magnesiumsulfat (MgSO ₄)
	MOPS (3-N-Morpholinopropanesulfonsäure)
	Natriumchlorid

Hersteller	Chemikalien, Gase, Enzyme und Medien
<i>Sigma, Taufkirchen</i>	Natriumacetat Percoll Ponceau S 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (Tetrazolium) TWEEN20 (Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat) Thioharnstoff X-Galaktose 8-(4-Chlorophenylthio)-Guanosin 3",5"-zyklisches Monophosphat Salz (8-pCPT-cGMP) N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME)
<i>Universitätsapotheke Greifswald</i>	Ethanol (96 %, MEK-vergällt)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Hersteller	Bezeichnung
Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, Frankreich	Flacons 50 ML Pipetenspitzen
B Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland	Einmalspritze 5 ML Einmalspritze 20 ML
Catgut GmbH	Chirurgische Naht, Greenfil, PET-Faden, geflochten, unbeschichtet 2/0 USP, DRT18, 70 cm Chirurgische Naht, Greenfil, PET-Faden, geflochten, unbeschichtet 3/0 USP, 50 cm
Staedtler, Nürnberg, Deutschland	Druckerfolie, Lumorcolor ink Jet Transparent Film

2.1.3 Geräte und Hilfsmittel

Gerät	Bezeichnung
Biopsiebohrer	Fussluning
Brutschrank	Heracell, Heraeus, Hanau
Einfrierbox	VWR TM , Hamburg
Einfrierröhrchen	Nunc, Kirchheim
Elektroblotkammer	Criterion TM Cell, Biorad, München mit Power Pack 300, Biorad, München
Elektrophoresekammer (DNA)	SubCell Model 192, Biorad, München
Elektrophoresekammer (RNA)	Blue Marine 100, Serva, Heidelberg
Elektrophoresekammer (Protein - Westernblot)	Minigel Twin, Whatman Biometra, Göttingen
Feinwaage	Sartorius
Filterpapier	Whatman International, Buckinghamshire, England
Heizblock	Biometra® Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Hybridisierungsflaschen	Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen

Gerät	Bezeichnung
Hybridisierungsöfen	Biometra Compact Line OV4, Biometra® Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
IEF-Gerät	Multiphor II, Pharmacia Biotech mit Electrophoreses Power Supply EPS 3501XL
Konfokales Lasermikroskop	Visitech confocal laser scanning microscope mit confocal head QLC100 geliefert von Chromaphor, Duisburg
Kryoröhrchen	Nalgene Cryogenic Vials, Nalge®Brand Products, Denmark
Küvetten 220-1.600 nm	Eppendorf, Hamburg
Laminarflowbox	Herasafe HS18, Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop	Axiovert 25, Zeiss, Reutlingen
Magnetrührgerät MR 3001	Heidolph, Schwabach
Mikrotiterplatten (TaqMan)	96-Loch Optical Reaction Plate, Applied Biosystems, Weiterstadt
Mikrotiterplatten (Proteinbestimmung)	Nuncclon™ Surface, Nunc Brand Products, Denmark
Mikrotiterplatten-Lesegerät	1420 Victor Multilable Counter, Wallac, USA
Nitrozellulose-Membran	Protan® Nitrocellulose Transfer Membrane, Schleicher und Schuell GmbH, Dassel
PCR Cycler	Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	pH 526, WTW, Weilheim
Photometer	BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg
Plattensequencer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Quarzküvette	Bender + Hobein, Ulm
Real-time PCR Cycler	ABI PRISM 7700 Sequence Detector, Applied Biosystems, Weiterstadt
Röntgenfilme	X-Ray Film, AGFA, Belgien
Röntgenfilmkassette	Hyperkassette, Amersham Biosciences, Freiburg
Rotationsinkubator	Mixing Rotor Variospeed, Renner GmbH, Dannstadt
Sauger	neoLab, Heidelberg
Scanner	SAPHIR ultra2, Linotype, PS GmbH
Schüttler	Rocking Platform, Biometra®Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Sequenziergerät	ABI PRISM 377 DNA Sequencer, Applied Biosystems, Weiterstadt
Software	Microsoft Office XP SPSS ABI PRISM™PrimerExpress™ Oligonucleotide Selection Software KODAK Image Quant Sequence Analysis®Programm
Speedvac	Univapo 100 ECH, UniEquip, Martinsried
Spektrometer	Eppendorf
Spotpiker	Spotpiker Biorad, München
Sterilwerkbank	HERAsafe, Heraeus Instruments, Hanau
Stromversorgungsgerät	Standard Power Pack P25, Biometra®, Göttingen
Thermocycler	Perkin Elmer
Thermostat	Multitemp III, Amersham Biosciences, Freiburg

Gerät	Bezeichnung
Ultrazentrifugen	Beckmann LZ Ultracentrifuge, Beckman, USA Otima TM TL Ultracentrifuge 100.000 RPM, Beckman, USA
Ultraschallgerät	Bandelin electronicSH70G Sonopuls
UV-Licht-Kamera	Kodak ds Image Station 440 CF, Kodak, Stuttgart
Vortexer	Reax top, Heidolph, Schwabach
Waage	Explorer, Ohaus, Schweiz
Wasserbad	Julabo
Zellkulturflaschen	Gewebekulturflaschen Cellstar, Greiner, Frankreich BD, Falcon, Heidelberg
Zellkulturplatten	Multiwell TM 6-Loch, Falcon, Frankreich
Zellzählgerät	CASY [®] ONE, Schärfe Systems, Freiburg
Zentrifugen	Contrikon T 1170; Contron Instruments, Italien Zentrifuge 5415R, eppendorf, Hamburg Rotixa 500 Hettich Zentrifugen, Tuttlingen Galaxy Mini, VWR TM , Hamburg Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments, Hanau

2.1.4 Software

Hersteller	Bezeichnung
SPSS inc., Chicago USA	SigmaStat SigmaPlot
Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim	Excel
University of Texas Health Science Center, San Antonio, USA	ImageTool

2.1.5 Puffer und Lösungen

Annealing-Puffer	Natriumchlorid	100 mM
	Hepes	50 mM
	eingestellt auf	pH 7,4
Blockierungslösung	Magermilchpulver	2,5 g
	TBST	47,5 ml
Calciumchlorid-Lösung 2 M	Calciumchlorid	7,3 g
	Aqua dest.	ad 25 ml
Curry-Master-Mix	Aqua ad injectabilia	595,75 µl
	Tris-HCl	46 µl
	2 M KCl	57,5 µl
	25 mM MgCl ₂	276 µl
	Glycerol	92 µl
	10 mM dNTPs	46 µl
	Rox Reference Dye	23 µl
	Platinum [®] Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	8 µl
Einfriermedium	FCS	90 %
	DMSO	10 %

HeBS (2x)	Natriumchlorid	16,4 g
	Hepes	11,9 g
	Natriumhydrogenphosphat- monohydrat	252 mg
	mit NaOH	auf pH 7,05
Kontrollpuffer	Aqua dest.	ad 1.000 ml
	Calciumchlorid	1,26 mM
	Magnesiumsulfat	0,81 mM
	Kaliumdihydrogenphosphat	0,44 mM
	Kaliumhydrogenphosphat	0,27 mM
	Natriumchlorid	142 mM
	HEPES	20 mM
	Natriumhydrogenkarbonat	5 mM
Kulturmedium (GP2 293-Zellen)	Glukose	5,55 mM
	DMEM high glucose with	
	Glutamax®	500 ml
	FCS	10 % (V/V)
Laemli-Puffer (4x)	Penicillin/Streptomycin	100 U/ml
	Tris pH 6,8	3,125 ml
	SDS	1 g
	Glycerol (100 %)	5 ml
	Bromphenolblau	0,005 g
	β-Mercaptoethanol	25 ml
	Aqua dest.	ad 12,5 ml
	Trypton	10 g
LB-Medium	Hefeextrakt	5 g
	Natriumchlorid	10 g
	Aqua dest.	ad 1.000 ml
	Tris-HCl	0,606 g
Lysepuffer pH 7,4	Natriumchlorid	0,584 g
	Triton X-100	100 µl
	EDTA (0,5 M)	1 ml
	Aqua dest.	ad 100 ml
Microspheres-Lösung	Fluorescent Polymer Microspheres	250 mg
	Natriumchloridlösung (0,9 %)	ad 100 ml
modifiziertes Claycomb-Medium	FCS	50 ml
	Penicillin	100 U/ml
	Streptomycin	100 µg/ml
	L-Glutamin	2 mM
	Claycomb-Medium	ad 500 ml
	Natriumchlorid	117 mM
modifizierter Krebs-Henseleit- Puffer	Kaliumchlorid	2,6 mM
	Magnesiumsulfat	1,2 mM
	Kaliumdihydrogenphosphat	1,2 mM
	HEPES	25 mM
	Glukose	11 mM
Natriumacetat-Lösung 3 M	Natriumacetat	10,206 g
	Aqua dest.	ad 25 ml
	mit Eisessig	auf pH 5,2
Natriumdodecylsulfat (SDS) 10 % (V/V)	SDS	1 g
	Aqua dest.	ad 10 ml

PBS	Natriumchlorid	1,35 M
	Kaliumchlorid	30 mM
	Natriumhydrogenphosphat	80 mM
	Kaliumdihydrogenphosphat	20 mM
	pH 7,4	
Pentobarbital/Heparin	Pentobarbital-Natrium (0,5 g/20 ml)	3 ml
	Heparin-Natrium (5.000 I.E./ml)	0,3 ml
Sammelgelpuffer	Tris-HCl	6 g
	mit NaOH	auf pH 6,8
	Aqua dest.	ad 100 ml
Stresspuffer	Calciumchlorid	1,26 mM
	Magnesiumsulfat	0,81 mM
	Kaliumdihydrogenphosphat	0,44 mM
	Kaliumhydrogenphosphat	0,27 mM
	Kaliumchlorid	142 mM
	HEPES	20 mM
	Natriumhydrogencarbonat	5 mM
	Glukose	5,55 mM
	Natrium-(Orto)-vanadat	1 mM
Stripping Puffer	Tris	7,75 g
	SDS	20 g
	mit HCl	auf pH 6,8
	Aqua dest.	ad 1.000 ml
	Tankpuffer (10x)	
Tankpuffer (10x)	Tris-Base	60 g
	Glycin	288 g
	SDS	7 g
	Aqua dest.	ad 1.600 ml
	Tankpuffer (1x)	10x Tankpuffer
TBS (10x)	Aqua dest.	ad 1.000 ml
	Natriumchlorid	1,37 M
	Kaliumchlorid	26,8 mM
	Tris-Base	247,6 mM
TBST	pH 7,6	
	TBS	1 x
	Tween 20	0,1 % (v/v)
Transferpuffer (10x)	Tris	116 g
	Glycin	59 g
	SDS	7 g
	Aqua dest.	ad 2.000 ml
TTC-Lösung	PBS	10 ml
	TTC	0,2 g

2.1.6 Versuchstiere

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Ratten vom Stamm Wistar weiblichen Geschlechts verwendet.

Zum Zeitpunkt der Herzentnahme für die *ex-vivo* perfundierten Langendorf-Herzen oder zur Isolation von adulten Rattenkardiomyozyten waren alle Tiere zwischen 3-4 Wochen alt und hatten ein Gewicht zwischen 180 und 200 g. Die Tiere wurden von der Firma Harlan Laboratories Inc., ansässig in Indianapolis (Indiana, USA), bezogen und bis zur Durchführung der Herzentnahme im Tierstall der Pathologie der Universität Greifswald bei konstantem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h und einer Temperatur von 23 °C gehalten.

2.1.7 Zelllinien

In dieser Arbeit wurde mit verschiedenen Zelllinien gearbeitet.

GP2-293 Zellen

Die GP2-293 Zelllinie ist ein Abkömmling von HEK 293 Zellen und dient als Verpackungszelllinie. Die Zellen haben in ihrem Genom die *pol*- und *gag*-Gene von MoMLV (Molomey murine leukemia virus) stabil exprimiert und dienen zur Vermehrung und Gewinnung von Retroviren, die die siRNA-tragenden Vektoren enthalten.

H4IIE Zellen

H4IIE ist eine Rattenhepatom-Zelllinie, die vom Reuber-H35-Hepatom (Reuber, 1961) abstammt und von Pitot als kontinuierliche Linie etabliert wurde (53). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von der AG um Prof. H. Kroemer und Dr. Markus Grube zur Verfügung gestellt und wurde in dieser Arbeit als Zielzellen für die virale Transfektion verwendet.

A7r5 Zellen

A7r5 Zellen sind glatte Muskelzellen mit adultem Phänotyp, die aus der Aorta von Rattenembryonen (*Rattus norvegicus*) gewonnen wurden (54) und von der Firma ATCC (ATCC® CRL-1444) geliefert wurden. Diese Zelllinie wurde ebenfalls als Zielzellen für die virale Transfektion verwendet.

HL-1 Zellen

HL-1 sind Zellen einer adhärent wachsenden Herzmuskelzelllinie, die durch Abwandlung von der AT-1 Zelllinie (eine Mauszelllinie von atrialen Kardiomyozyten) von W. Claycomb entwickelt wurde. Trotz des regelmäßigen Passagierens besitzen die HL-1 Zellen die Fähigkeit zur Kontraktion und behalten ihre differenzierten herzmorphologischen, biochemischen und elektrophysiologischen Eigenschaften bei (W. Claycomb, New Orleans, LA 1998).

2.1.8 Antikörper

Primär-Antikörper

AMF-Serum [1:100]

SNG-Serum [1:50]

Sekundär-Antikörper

Alexa fluor 568 anti-Kaninchen [1:200]

oder Alexa fluor 488 anti-Kaninchen [1:200]

2.1.9 Oligonukleotide

2.1.9.1 Primer und Sonden für die quantitative PCR

Primer und Sonden wurden von der Firma TIB MOLBIOL, Berlin, bezogen.

ABCC 4 Forward-Primer: 5'-CGAGTAGCCATGTGCCATATGA-3'

ABCC 4 Reverse-Primer: 5'-TGACTATCTGGCCTGTGGTTGTCT-3'

ABCC 4 TaqMan[®]-Sonde: 5'-FAM-CGGAAGGCACTTCGTCTTAGTAACATGGC-TAMRA-3'

ABCC 5 Forward-Primer: 5'-CACCATCCACGCCTACAATAAA-3'

ABCC 5 Reverse-Primer: 5'-CACCGCATCGCACACGTA-3'

ABCC 5 TaqMan[®]-Sonde: 5'-FAM-CGTTGGTTGTCATCCAGCAGCTCCT-TAMRA-3'

2.1.9.2 siRNA-Sequenzen

Mit Hilfe der *Dharmacon* Website für siRNA-Design wurden geeignete, gegen die membranständige Transporter (für Maus und Ratte) ABCC 4/5 gerichtete, siRNA-Sequenzen ausgewählt:

Maus:

ABCC 4_siRNA_fw

5'-CGAACCC-GCC GTA TGT CTT GCT GCA GAA T-TTCAAGAGA-A TTC TGC AGC AAG ACA TAC GGC-TTTTTGGAAC-3'

ABCC 4_siRNA_rv

5'-TCGAGTTCCAAAAA- GCC GTA TGT CTT GCT GCA GAA T -TCTCTTGAA- A TTC TGC AGC AAG ACA TAC GGC -GGGTT-3'

ABCC 4_siRNA_fw

5'-CGAACCC- GCG AAG TAG AGA ATA TGA TGA T -TTCAAGAGA- A TCA TCA TAT TCT CTA CTT CGC -TTTTTGGGAAC- 3'

ABCC 4_siRNA_rv

5'-TCGAGTTCCAAAAA- GCG AAG TAG AGA ATA TGA TGA T -TCTCTTGAA-A TCA TCA TAT TCT CTA CTT CGC -GGGTT - 3'

ABCC 4_siRNA_fw

5'-CGAACCC- GTC AGC TGG TAC TTA GGA ATT T-TTCAAGAGA- A AAT TCC TAA GTA CCA GCT GAC -TTTTTGGGAAC- 3'

ABCC 4_siRNA_rv

5'-TCGAGTTCCAAAAA- GTC AGC TGG TAC TTA GGA ATT T -TCTCTTGAA-A AAT TCC TAA GTA CCA GCT GAC -GGGTT- 3'

ABCC 4_siRNA_fw

5'-CGAACCC- GGA GTC ATC GTC TTC GAC AAT -TTCAAGAGA- ATT GTC GAA GAC GAT GAC TCC -TTTTTGGGAAC- 3'

ABCC 4_siRNA_rv

5'-TCGAGTTCCAAAAA- GGA GTC ATC GTC TTC GAC AAT -TCTCTTGAA-ATT GTC GAA GAC GAT GAC TCC -GGGTT- 3'

ABCC 5_siRNA_fw

5'-CGAACCC-GCC TGC TGC GTC ACT GTA AGA T-TTCAAGAGA-A TCT TAC AGT GAC GCA GCA GGC-TTTTTGGAAC3'

ABCC 5_siRNA_rv

5'-TCGAGTTCCAAAAA- GCC TGC TGC GTC ACT GTA AGA T -TCTCTTGAA-A TCT TAC AGT GAC GCA GCA GGC -GGGTT-3'

ABCC 5_siRNA_fw

5'-CGAACCC-GCT GAG ATG TTT ATT CAG AAT -TTCAAGAGA-ATT CTG AAT AAA CAT CTC AGC -TTTTTGGGAAC3'

ABCC 5_siRNA_rv

5'-TCGAGTTCCAAAAA- GCT GAG ATG TTT ATT CAG AAT -TCTCTTGAA- ATT CTG AAT AAA CAT CTC AGC -GGGT-3'

ABCC 5_siRNA_fw

5'-CGAACCC-GCC TCT CTC GTT TCA GCC ATT T-TTCAAGAGA-A AAT GGC TGA AAC GAG AGA GGC -TTTTTGGAAC3'

ABCC 5_siRNA_rv

5'-TCGAGTTCCAAAAA- GCC TCT CTC GTT TCA GCC ATT T -TCTCTTGAA- A AAT GGC TGA AAC GAG AGA GGC -GGGT-3'

ABCC 5_siRNA_fw

5'-CGAACCC-GTA CCA CCA CTG GCC TGA TGA T-TTCAAGAGA-A TCA TCA GGC CAG TGG TGG TAC -TTTTTGGAAC3'

ABCC 5_siRNA_rv

5'-TCGAGTTCCAAAAA- GTA CCA CCA CTG GCC TGA TGA T -TCTCTTGAA-A TCA TCA GGC CAG TGG TGG TAC -GGGT-3'

Ratte:**ABCC 4_siRNA_fw**

CGAACCCGTAGAGGAGGTACAACCTTAATTCAAGAGATTAAGTTGTACCTCCTCTA CTTTTTGGAAC

ABCC 4_siRNA_rv

TCGAGTTCCAAAAAGTAGAGGAGGTACAACCTTAATCTCTTGAATTAAGTTGTACC TCCTCTACGGGT

ABCC 4_siRNA_fw

CGA ACC CGA TCA AGA ACT TTC TGT TAC TTT CAA GAG AAG TAA CAG AAA GTT CTT GAT CTT TTT GGA AC

ABCC 4_siRNA_rv

TCGAGTTCCAAAAAGATCAAGAACTTTCTGTTACTTCTCTTGAAGTAACAGAAA GTTCTTGATCGGGT

ABCC 4_siRNA_fw

CGAACCCGGATCAAGAACTTTCTGTTACTTCAAGAGAGTAACAGAAAGTTCTTGA TCCTTTTTGGAAC

ABCC 4_siRNA_rv

TCGAGTTCCAAAAAGGATCAAGAACTTTCTGTTACTTCTCTTGAAGTAACAGAAAG TTCTTGATCCGGGT

ABCC 5_siRNA_fw

CGAACCCGGAAGCTAGTGGTTCACAATTCAAGAGATTGTGAACCACTAGCTTCCT TTTTGGAAC

ABCC 5_siRNA_rv

TCGAGTTCCAAAAAGGAAGCTAGTGGTTCACAATCTCTTGAATTGTGAACCACTA
GCTTCCGGGT

ABCC 5_siRNA_fw

CGAACCCGAGTTTGTCTAATGGAATCAAGAGATTCCATTAGAAACAACTCT
TTTTGGAAC

ABCC 5_siRNA_rv

TCGAGTTCCAAAAAGAGTTTGTCTAATGGAATCTCTTGAATTCCATTAGAAAC
AAACTCGGGT

ABCC 5_siRNA_fw

CGAACCCGCATCCGTTGCTGTTGACATTCAAGAGATGTCAACAGCAACGGATGCT
TTTTGGAAC

ABCC 5_siRNA_rv

TCGAGTTCCAAAAAGCATCCGTTGCTGTTGACATCTCTTGAATGTCAACAGCAAC
GGATGCGGGT

2.1.10 Verwendete Vektoren

Der Ursprungsvektor pQCXIH wurde von der Firma BD Bioscience Clontech bezogen und ist ein pBR322-Derivat, der selbst nicht replikationsfähig ist. Dieser retrovirale Vektor pQCXIH (Abb. 2.1) ist ein bicistronischer, selbst-inaktivierender Expressionsvektor, der zur Expression von Zielgenen entworfen wurde. pQCXIH besteht aus einem 5`LTR (long terminal repeat) mit einem hCMV/MSV-Promotor und dem Verpackungssignal ψ , sowie der 3`LTR des MoMLV (Molomey murine leukaemia virus) mit einer Deletion in der U3-Region. Zwischen 5`LTR und 3`LTR liegt eine Expressionskassette aus dem hCMV-Promotor, einer MCS (multiple cloning site), der IRES (internal ribosom entry side) sowie des Hygromycin-Resistenzgenes. Des Weiteren trägt der Vektor außerhalb dieser Region den Promotor mit dem *ori* (origin of replication) des SV40.

Durch eine Transfektion mit diesem Vektor allein können keine Viren gebildet werden, da er keine Information für Hüllproteine enthält. Erst durch eine Ko-Transfektion mit einer Verpackungszelllinie, wie GP2-293, mit dem Vektor pVSV-G (pBR322-Derivat) werden infektiöse Viren generiert, da dieser Vektor die Information für die Hüllproteine des VSV-Virus codiert.

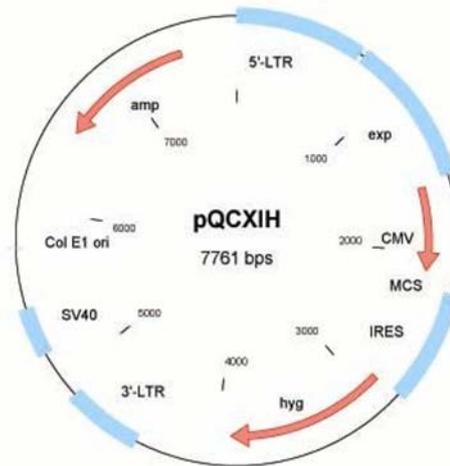


Abb. 2.1: Darstellung des Ursprungsvektors pQCXIH.

Dieser Ursprungsvektor wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Roskopf noch zusätzlich verändert, indem ein Fragment eingefügt worden ist, dass für ein grün fluoreszierendes Protein (pEGFP-C1) codiert. Dadurch kann die Effektivität der Transfektion an einem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert werden. Ebenso wurde der H1-Pomotor hinzugefügt, der dafür verantwortlich ist, dass die nachfolgend eingebaute siRNA laufend abgelesen werden kann.

Die nun als V4 und V5 bezeichneten Vektoren unterscheiden sich lediglich in der Richtung, in der die spezifische siRNA in das Plasmid eingebaut und abgelesen wird. In Abb. 2.2. sind die beiden verwendeten Vektoren V4 und V5 dargestellt.

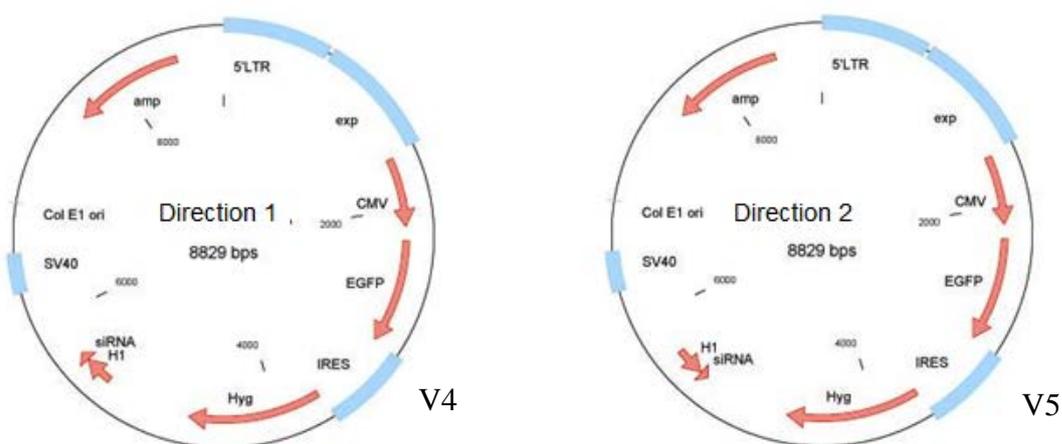


Abb. 2.2: Darstellung der verwendeten Vektoren V4 und V5. V4 und V5 Vektor unterscheiden sich in der Richtung, in der die siRNA in das Plasmid eingebaut und abgelesen wird.

2.2 Methoden

Für die vorliegende Arbeit wurden Herzen von Ratten verwendet. Die Durchführung der Organentnahme wurde dem Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommerns mitgeteilt.

2.2.1 *Ex vivo* perfundiertes Rattenherz

Das *ex vivo* perfundierte Herz, Langendorff -Herz, ist ein Modell zur Untersuchung des akuten Myokardinfarktes und dient dem besseren Verständnis kardiologischer Funktionen. Hierbei wird das Herz von Säugetieren, wie zum Beispiel der Ratte, isoliert und mit der Aorta an die Langendorff-Apparatur befestigt. Das Herz wird bei konstant gehaltenem hydrostatischen Druck mit einer Nährlösung retrograd perfundiert. Durch die retrograde Flussrichtung werden die Aortenklappen in einem geschlossenen Zustand gehalten, sodass die Perfusionsflüssigkeit in die Eingänge der Koronarien gedrückt wird. Dadurch wird die Versorgung des gesamten Herzmuskels sichergestellt. Die Nährlösung gelangt über den Sinus coronarius zuerst in den rechten Vorhof. Von dort in den rechten Ventrikel und schließlich über die Ausflussbahn in den Truncus pulmonalis, wo sie als Effluent aufgefangen und ermittelt werden kann. Unter diesen experimentellen Standardbedingungen ist das Herz in der Lage, seine Kontraktionsfähigkeit über mehrere Stunden aufrecht zu erhalten. Dieses System ermöglicht es, durch Verschluss und Wiedereröffnung eines Koronargefäßes, einen akuten Myokardinfarkt zu simulieren. Die Auswirkungen biochemischer, physiologischer, morphologischer und pharmakologischer Aspekte, sowie die Entwicklung von Strategien für neue Behandlungen lassen sich mit dieser Methode studieren. So kann in Abwesenheit von Störfaktoren, wie zum Beispiel der Kreislaufzirkulation, der Einfluss von Hormonen und anderen Organen, das Herz zunächst allein analysiert werden.

2.2.1.1 Operative Technik

Die Ratten wurden mittels einer intraperitonealen Injektion von Thiopental (0,6 mg/kg IP) und einer Zugabe von Heparin (4.000 IU/kg IP) narkotisiert. Nach Testung neurologischer Reflexe, dem Rückschluss einer erfolgreichen Narkose, wurde mit der Eröffnung des Brustkorbes begonnen. Zuerst erfolgte ein Hautschnitt parallel zu den Rippen, am kaudalen Ende des Sternums am Proc. Xiphoideus. Um die Hautschicht von der Muskelschicht zu trennen, folgten zwei weitere Hautschnitte parasternal kranialwärts zu den Achseln. Es folgte ein Schnitt durch die Bauchmuskulatur am kaudalen Ende des Proc. Xiphoideus. Der ausgeprägte Proc. Xiphoideus wurde mit der Pinzette gehalten und leicht nach oben gezogen. Mit der Sicht auf

die Leber und das Zwerchfell, konnte das Zwerchfell durchtrennt werden. Nun erfolgte parasternal ein Schnitt kranialwärts durch die Rippen zu den Achselhöhlen. Der geöffnete Brustkorb wurde nach kranial geklappt. Mit Sicht auf das schlagende Herz und den Herzbeutel konnte letzterer vorsichtig gelöst werden. Durch Verschiebung des Thymus kranialwärts wird die Aorta sichtbar. Das Herz wurde mit Daumen, Zeige- und Mittelfinger leicht angehoben und gehalten. Die Aorta ascendens wurde mit der Schere durchtrennt und das Herz vorsichtig in die bereitgestellte 4 °C kalte 0,9 % NaCl-Lösung gelegt. Unverzüglich wurde das Herz an die Langendorff-Apparatur gegangen und mit dem modifizierten Krebs Henseleit Puffer perfundiert. Dieser Puffer wurde bereits auf 37 °C temperiert und mit 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid begast. Die kontraktile Funktion und der Herzrhythmus setzten sich nach einigen Sekunden (sek) zurück. Die Maximalfunktion des Herzens ist nach ca. 10 min. erreicht.

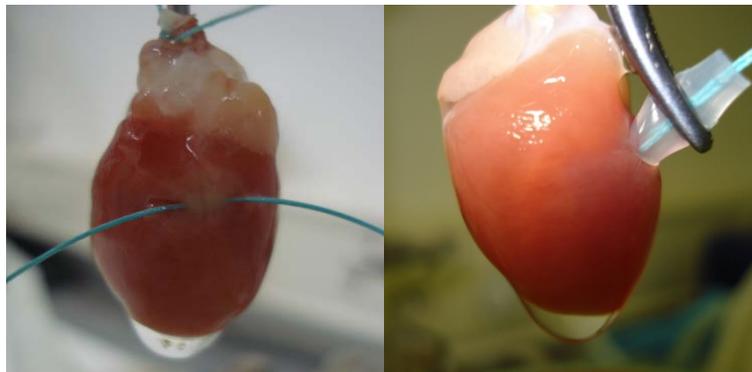


Abb. 2.3: Rattenherz an der Langendorff-Apparatur. Das linke Bild zeigt ein fixiertes isoliertes Herz an der Langendorff-Anlage. Die linke Koronararterie wurde mit einer Nadel-Faden-Kombination umstochen. Das rechte Bild zeigt das isolierte Herz während der Ischämie. Das umstochene Koronargefäß wurde mit Hilfe eines kurzen PVC-Schlauches und einer Klemme verschlossen.

In der Einschlagsphase wurde die linke Koronararterie mit einer 2-0 Nadel-Faden-Kombination kurz unter dem linken Herzohr umstochen. Zum Verschluss der linken Koronararterie wurden beide Enden des Umstechfadens durch ein kurzes Stück eines dünnen PVC-Schlauches gefädelt (Abb. 2.3). Dann wurde der Schlauch auf das Koronargefäß gedrückt und mittels Klemme fixiert. Am Ende der Ischämiephase wurde die Klemme und der PVC-Schlauch entfernt und somit die Perfusion des gesamten Herzens wiederhergestellt.

Der Versuchsablauf war für alle Gruppen einheitlich. Nachdem das Herz an der Langendorff-Apparatur befestigt wurde, gab es eine 30 min Einschlagphase, gefolgt von 30 min Ischämiephase und anschließender 2 h Reperfusionphase. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde der Koronarfluss ermittelt. In Abb. 2.4 ist schematisch der zeitliche Versuchsablauf des *ex vivo* perfundierten Rattenherzexperimentes dargestellt.

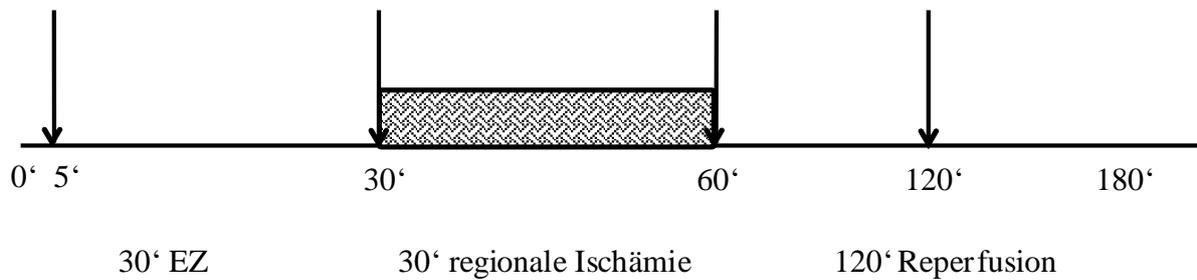


Abb. 2.4: Schematische Darstellung des Versuchsablauf eines *ex vivo* perfundierten Rattenherzexperimentes. Alle Herzen wurden einer 30 minütigen Einschlagphase (EZ), einer regionalen Ischämie von 30 min und einer anschließenden Reperfusion von 120 min unterzogen. Die Pfeile zeigen die Messzeitpunkte für den Koronarfluss an.

2.2.1.2 Gruppeneinteilung

In der Kontrollgruppe erfolgte der Versuchsablauf ohne eine sonstige Behandlung des Herzens. In der BAY 58-2667 Gruppe wurden die Herzen mit dem sGC-Aktivator BAY 58-2667 behandelt. BAY 58-2667 wurde dem Herzen fünf min vor dem Ende der Ischämie über die Apparatur im Perfusat zugeführt, sodass dieses rechtzeitig zu Beginn der Reperfusion am Herzen angekommen. Des Weiteren wurden unterschiedliche Antagonisten appliziert, um entsprechende Signalkaskaden zu untersuchen. Die Zugabe der verschiedenen Antagonisten KT-5823, einem PKG-Inhibitor, und L-NAME, einem NOS-Inhibitor, erfolgte zehn min vor dem Ende der Ischämie, damit diese Substanzen vor dem sGC-Aktivator BAY 58-2667 ihre Wirkung am Herzen erzielen konnten. Alle Substanzen wurden bis zum Ende der zweistündigen Reperfusion verabreicht (siehe Abb. 2.5).

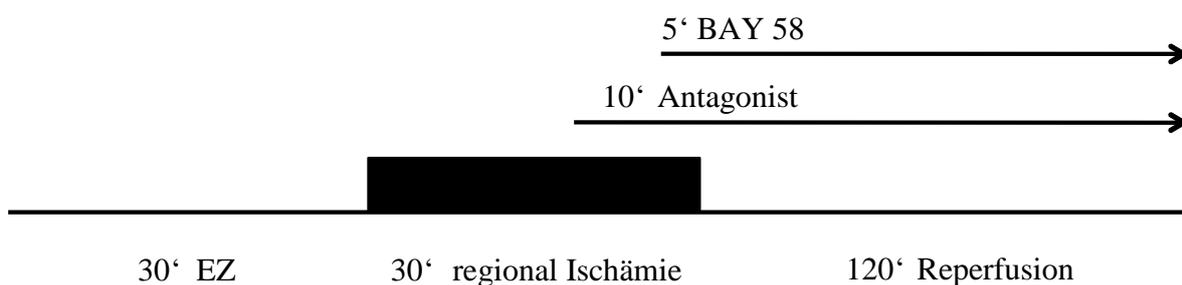


Abb. 2.5: Substanzapplikation im *ex vivo* perfundierten Rattenherzexperiment. Die Pfeile zeigen den Beginn und das Ende der Zugabe der Substanzen. BAY 58-2667 wurde 5 min, die Antagonisten 10 min vor dem Ende der Ischämie appliziert. EZ=Einschlagzeit, Antagonisten: KT-5823 und L-NAME.

Die Tab. 2.1 zeigt eine Übersicht der verschiedenen Versuchsgruppen, der verwendeten Stoffkonzentrationen und der jeweiligen durchgeführten Untersuchungen.

Tab. 2.1: Gruppeneinteilung für das *ex vivo* perfundierte Rattenherzexperiment

Gruppen	Konzentration	Monitoring	Spezielle Untersuchung
Kontrollgruppe HW		Fluss	Infarktgröße als % der Risikozone
BAY 58-2667	1 nM; 50 nM; 1 μ M	Fluss	Infarktgröße als % der Risikozone
BAY 58-2667	50 nM;	Fluss	Infarktgröße als % der Risikozone
BAY 58-2667 + KT-5823	50 nM; 1 μ M	Fluss	Infarktgröße als % der Risikozone
BAY 58-2667 + L-NAME	50 nM; 200 μ M	Fluss	Infarktgröße als % der Risikozone
BAY 58-2667 + 5-HD	50 nM; 100 μ M	Fluss	Infarktgröße als % der Risikozone

2.2.1.3 Infarktgrößenbestimmung

Um die Ausprägung eines akuten Myokardinfarktes zu bestimmen, wurde nekrotisiertes Gewebe mittels eines Tetrazoliumsalzes angefärbt. Dieses Salz wird nur in vitalem Gewebe von Dehydrogenasen zu einem Formazanpigment umgesetzt. Während lebendes Gewebe rot erscheint, stellt sich totes Gewebe weiß dar. Die Infarktgröße wird standardmäßig angegeben als Prozent des Infarktes vom Risikoareal, wobei letzteres dem Versorgungsgebiet der umstochenen Koronararterie entspricht. Dieses Areal wird mit Hilfe fluoreszierender Mikropartikel (microspheres) markiert, welche schließlich unter UV-Licht sichtbar gemacht werden, wobei sich das Risikoareal dunkel darstellt, während der Rest des Herzens grün fluoresziert.

Am Ende der zweistündigen Reperfusion wurde das Gefäß durch Verknoten des Fadens erneut verschlossen und 2 ml einer Microsphereslösung injiziert. Dann wurde das Herz für 30 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Anschließend wurden mit Hilfe einer Rasierklinge ca. 2 mm starke transversale Schnitte angefertigt und in 25 ml einer TTC (Triphenyltetrazoliumchlorid)-Lösung bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 5 min gefärbt. Zuletzt wurden die Gewebeschnitte zur Fixierung in einer 4%-igen Paraformaldehydlösung für 24 h gelagert. Die Infarktgröße wurde planimetrisch bestimmt (Abb. 2.6). Dafür wurden die Schnitte zwischen zwei Glasplatten gelegt. Um die einzelnen Schnitte auswerten zu können, wurde eine zusätzliche Klarsichtfolie auf die Oberseite gelegt. Auf dieser wurden die Umrisse der Schnitte, das Risikoareal (unter UV-Licht) und das

infarzierte Gewebe markiert. Die Folie wurde zusammen mit einem Größenstandard eingescannt und die Infarktgröße durch das Programm ImageTool bestimmt. Hierfür wurde von jedem einzelnen Schnitt die Fläche des Risiko- und des Infarktareals ausgemessen. Das Volumen wurde durch Multiplikation der Schnittdicke (2 mm) bestimmt. Dementsprechend ergab sich das Gesamtvolumen von Risikoareal und Infarkt durch Summierung der Einzelvolumina. Die Infarktgröße wurde als % Infarkt vom Risikoareal definiert.



Abb. 2.6: Infarktgrößenbestimmung. Die Bestimmung der Infarktgröße erfolgte planimetrisch. Das linke Bild zeigt die durch TTC-gefärbten Herzscheiben. Rechts ist die Klarsichtfolie gezeigt, auf der das Risikoareal (blau) und das infarzierte Gewebe (rot) dargestellt ist.

2.2.1.4 Gewinnung transmuraler Biopsien

Zur Untersuchung des cAMP und cGMP Gehaltes der Rattenherzen nach Behandlung mit BAY 58-2667 wurden Biopsien entnommen. Hierfür wurde, wie oben beschrieben, das Rattenherz isoliert und an der Langendorff-Apparatur mit modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert. Alle Herzen wurden einem Protokoll aus 30 min Einschlagen, 30 min globaler Ischämie (komplette Unterbrechung der Pufferzufuhr) und 10 min Reperfusion unterzogen. Die erste Probe wurde nach 25 min Einschlagen (baseline), an der Herzspitze, und die Zweite nach 10 min Reperfusion, aus dem linken Ventrikel, gewonne zur Untersuchung der cAMP und cGMP Konzentrationen mittels Radioimmunassay während der Ischämie/Reperfusion. Es wurden transmurale Biopsien von den Herzen der Kontrolltiere und den mit 50 nM BAY 58-2667 behandelten Herzen geschaffen. Die Entnahme des Biopsiematerials erfolgte mittels eines elektrischen Bohrers. Der Bohrkopf besteht aus einer Hülse mit messerscharfen Rand, die, ob der Rotation, in den Herzmuskel schnitt. Beim Herausziehen der Bohrhülse wurde die Probe extrahiert und sofort in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.1.5 Radioimmunoassay

Die, wie im Punkt zuvor beschrieben, erworbenen Rattenherzgewebestücke wurden gewogen und in 300 µl Homogenisierungspuffer mit 1 mM IBMX, aufgenommen. Mittels Ultraschall wurden alle Zellstrukturen aufgebrochen. Dann wurden die Proben über 30 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand für die Bestimmung der cAMP und cGMP Konzentrationen verwendet. Die zyklischen Nukleotide, cAMP und cGMP, wurden mittels eines kommerziellen

Radioimmunoassay KIT (IBL-Transatlantic Corp., Toronto, Kanada) bestimmt. Jede Probe wurde, streng anhand des hochsensitiven Herstellerprotokolls, zweimal vermessen. Die untere Nachweisgrenze des KIT betrug 5 fmol.

2.2.2 Isolation von adulten Rattenkardiomyozyten (ARK)

Die ventrikulären Kardiomyozyten werden an einer modifizierten Langendorff-Perfusionsapparatur, nach Powell (55) und Piper (56) isoliert. Dabei handelt es sich um ein offenes System mit einer konstanten Flussgeschwindigkeit von 10 ml/min. Diese Anlage perfundiert das Herz retrograd über die Aorta und erlaubt so die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen. Zur Gewährleistung einer konstanten Umgebungstemperatur von 37 °C besteht ein parallel geschaltetes Heizsystem des oberen Reservoirs, der Wendel und des Auffangbechers. Zusätzlich sind die Gefäße mit Parafilm verschlossen, um die Temperatur zu erhalten. Im oberen Reservoir befindet sich eine Pufferlösung, der im Laufe der Isolation Enzyme zugesetzt werden. Hier wird sowohl während, als auch vor der Isolation mit Carbogengas (5 % CO₂, 95 % O₂) begast. Das obere Reservoir steht über eine 90 cm hohe Wendel-Säule in Verbindung mit einer angebrachten Kanüle. Diese Kanüle ist Aufhängepunkt der isolierten Rattenherzen. Zur Vorbeugung von Luftembolien während der Perfusion, ist die sogenannte Blasenfalle (integriert in die Wendel) der Kanüle vorgeschaltet. Dieser Aufbau erzeugt einen Druck von ca. 90 cm Wassersäule, der mit einer Flussregulierung gesteuert werden kann. Unter dem Herz befindet sich ein Auffangbecher, dessen Ableitung mit Hilfe einer Peristaltikpumpe zur Rezirkulation der Enzymlösung eingesetzt wird.

Die Rattenherzen wurden, wie unter 2.2.1.1 beschrieben, entnommen und an der Langendorff-Apparatur retrograd perfundiert.

Nach 3 min Perfusion wird die Enzymlösung in das obere Reservoir gegeben. Damit werden die einzelnen Kardiomyozyten aus dem Gewebeverband gelöst. Nun wird die Langendorff-Anlage mit 75 ml Perfusionspuffer aufgefüllt und es folgt eine halbstündige Rezirkulation mit einer gleichbleibenden Geschwindigkeit von einem Tropfen pro Sekunde. Die homogene Färbung des Herzens zeigt einen gleichmäßigen enzymatischen Verdau an. Im Anschluss an die Rezirkulationsphase wird das Herz samt 10 ml der Perfusionslösung in eine Petrischale gegeben. Mit einer feinen Schere werden die Vorhöfe an der Ventilebene entfernt und die Ventrikel mit zwei Skalpell in ca. 1 mm³ großen Stücke zerkleinert. Die entstandene Zellsuspension wurde mit der restlichen Perfusionslösung für 15 min und unter Verwendung von Carbogen begast. Das ermöglicht eine weitere Sauerstoffversorgung, aber auch die enzymatische Isolation wird durch die Verwirbelung der Zellsuspension mechanisch

unterstützt. Anschließend wird die Suspension durch ein 200 µm feines Nygonsieb in zwei 50 ml Zentrifugen-Röhrchen filtriert. In drei Schritten wird die Suspension bei jeweils 43 rpm für eine min zentrifugiert, um die Kardiomyozyten von anderen Zellen, z.B. Fibroblasten, zu trennen. Die Myozyten setzen sich während der Zentrifugation ab. Der Überstand wurde verworfen. Um die Zellen in das calciumhaltige Milieu des Versuchspuffers zu überführen, wird Calciumisolierpuffer mit steigendem Calciumgehalt zugesetzt, zuerst mit 200 µM Ca²⁺, dann in einem zweiten Schritt Puffer mit 500 µM Calcium.

Um die Quantität einer Isolation zu beurteilen, wird die Anzahl der intakten Zellen unter einem Mikroskop mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer, bei zehnfacher Vergrößerung bestimmt. Gleichzeitig kann die Qualität beurteilt werden. Zellen gelten als intakt, wenn sie die für Kardiomyozyten typische Querstreifung aufweisen und eine glatte längliche Form besitzen. Die Gesamtzellzahl sowie die Anzahl der intakten Zellen werden ermittelt. Durchschnittlich lag die Gesamtzellzahl bei 2-3 Millionen und der Anteil der intakten Zellen bei 30 %. Da die Zellen untersucht werden sollen, müssen diese am Boden einer Versuchskammer fixiert werden. Als Versuchskammer wird ein 4-Loch-Objektträger mit Borosilikatboden verwendet. Die Grundfläche des einzelnen Löcher beträgt 1,8 cm², das Volumen 1,5 ml. Zuerst werden die Löcher mit 8 µg/cm² Laminin beschichtet und inkubieren so für mindestens eine h im Kühlschrank bei 4 °C. Die Versuchskammern werden mit ca. 5.000 Zellen in 600 µl Versuchspuffer befüllt. Die Zellen sedimentieren für eine h bei 4 °C im Kühlschrank und nach dem Anheften können die Zellen untersucht werden.

2.2.3 Zellkultur

2.2.3.1 Kultivierungsmethoden

Die Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilbank unter Verwendung steriler Gerätschaften durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C unter einer wasserdampfgesättigten 5%igen CO₂-Atmosphäre.

Um die in flüssigem Stickstoff gelagerten, eingefrorenen Zellen wieder kultivieren zu können, mussten die entsprechenden Kryoröhrchen in einem 37 °C warmen Ethanolbad langsam aufgetaut werden. Mit einer Pipette wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert und in eine 75 cm²-Zellkulturflasche mit 25 ml Medium gegeben. Nach Adhärenz der Zellen erfolgte der erste Mediumwechsel, um das Kulturmedium von Resten des Einfriermediums (DMSO) zu befreien.

Die Zellen metabolisieren bestimmte Bestandteile des Mediums oder dessen Zusätze und geben auch Stoffwechselprodukte an das Medium ab, so dass sich dessen Zusammensetzung und pH-Wert mit der Zeit ändern (erkennbar am Farbumschlag). Um dennoch ein gutes Wachstum der Zellen zu sichern, wurde alle drei Tage ein Mediumwechsel vorgenommen.

Der Zustand der Zellen wurde regelmäßig mit Hilfe eines Mikroskops überprüft. Wichtig dabei sind die Zelldichte, Menge an abgestorbenen Zellen und mögliche Kontaminationen mit Pilzen oder Bakterien.

Eine Passagierung der Zellen erfolgte, sobald sich ein konfluenter Zellrasen gebildet hatte. Dazu wurde das alte Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit 37 °C warmen PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 5 min in 3 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C inkubiert. Das Trypsin ist ein proteolytisches Enzym, das eine Ablösung der Zellen voneinander und vom Kulturgefäß bewirkt. Zusätzlich trägt EDTA zur Vereinzelnung der Zellen bei, indem es durch Entzug von Calcium-Ionen (Chelatbildung) zur Abkugelnung der Zellen führt. Da beides zur Zellschädigung führen kann, sollte die Inkubation nicht zu lange dauern und nach ca. 5 min durch Zugabe von 7 ml serumhaltigem Medium abgestoppt werden. Mit Hilfe einer Pipette wurden die Zellen resuspendiert und ein Aliquot Zellsuspension abgenommen, wenn die Bestimmung der Zellzahl erforderlich war.

Je nach Verdünnung wurde dann ein bestimmtes Volumen Zellsuspension zu 25 ml frischem serumhaltigem Medium gegeben.

2.2.3.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde das Gerät CASY®ONE eingesetzt. Dazu wurden 50 µl der Zellsuspension in 10 ml der isotonen Casy®ton-Lösung gegeben. Diese Mischung wird dann durch eine Kapillare mit festgelegtem Durchmesser mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit in die Messzelle gesaugt, wo die Zellen eine Messpore passieren, an der eine Spannung anliegt. Dort kommt es abhängig vom Zellvolumen zu einer Erhöhung des Widerstandes. Diese Änderung wird gemessen, gibt Aufschluss über die Zellzahl und erlaubt eine Unterscheidung zwischen Zelltrümmern, Zellaggregaten und toten bzw. lebenden Zellen.

2.2.3.3 Kryokonservierung

Zum Einfrieren wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA geerntet, 10 min bei 3.000 U/4 °C zentrifugiert, das verbleibende Zellsediment vorsichtig in 70 µl DMSO und 930 µl FCS resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf Röhrchen überführt. Das Einfrieren erfolgte in zwei

Schritten: zuerst 6 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, dann 24 h bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ und anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.3.4 Immunohistochemie

Zum Nachweis der Lokalisation von Proteinen in den Zellen werden diese mit Hilfe eines Primärantikörpers markiert und dieser wiederum mit fluoreszierenden, speziesspezifischen Sekundärantikörpern nachgewiesen.

Zunächst werden die Zellen bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper in 5%-iger FCS/PBS-Lösung über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Dann werden die Schnitte abermals im PBS-Bad gewaschen. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper wird aufgetragen und 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren Waschschritten mit PBS werden die fluoreszenzmarkierten Zellen mit einem Deckglas abgedeckt. Die Betrachtung der Zellen erfolgte mit einem konfokalen Lasermikroskop.

2.2.3.5 Transfektion mit FuGENE®

Die FuGENE 6-Transfektionsreagenz ist eine steril filtrierte Mischung von Lipiden (in nicht-liposomaler Form) und anderen Verbindungen in 80%-igen Ethanol. Die nicht-liposomale Form FuGENE 6-Reagenz zeichnet sich durch eine minimale Zytotoxizität aus und kann daher auf den Zellen verbleiben.

Die Transfektion erfolgte nach folgendem Protokoll, welches in Abb. 2.7 schematisch dargestellt ist.

Aussaat der Zellen

Die Zellen wurden 24 h vor Versuchsbeginn in dem entsprechenden Standardmedium in Sechslöcherkulturplatten in einer Dichte von 0,2 Mio. Zellen/Loch ausgesät. Die Zellen sollten zu Versuchsbeginn 50 bis 75 % konfluent sein.

Ansatz des Antisense-FuGENE-Gemisches

Für die Verdünnung von FuGENE 6-Reagenz wurde in ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß ausreichend serumfreies Medium (Optimem) gegeben, so dass sich ein Endvolumen von 200 μl ergab. Anschließend wurden 6 μl FuGENE 6-Reagenz direkt zum Medium gegeben, vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Transfektionsreagenz muss direkt zum Medium gegeben werden, um eine Adsorption am Plastikröhrchen sowie eine Ablösung von Kunststoffpartikeln von der Oberfläche des Röhrchens zu vermeiden. Beides könnte die Transfektionseffizienz nachteilig beeinflussen. Die erforderliche Menge an Plasmid-DNA

(2 µg) wurde zu pipettiert und damit auf das 10-fache der Endkonzentration verdünnt. Es wurde vorsichtig gemischt und 30 min zur Komplexierung bei Raumtemperatur inkubiert.

Vorbehandlung der Zellen

Kurz vor Zugabe der DNA-FuGENE-Komplexe wurden die Zellen durch zweimaliges Waschen mit serumfreien Optimem-Medium vorbereitet, da die im Serum enthaltenen Proteine mit den Lipiden aggregieren und damit die Transfektion behindern würden. Dazu wurde der Überstand mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt und 1 ml serumfreies Optimem-Medium hinzugegeben. Zuletzt wurden 0,9 ml serumfreies Optimem hinzugegeben.

Zugabe des Antisense-FuGENE-Gemisches

Nach Ablauf der 30 min wurden je 100 µl des DNA-FuGENE-Gemisches zu einem Loch der Sechslöchkulturplatte gegeben. Durch vorsichtiges Schwenken der Platte wurde eine gleichmäßige Verteilung des Gemisches über den Zellrasen erreicht. Die Inkubation erfolgte 24 h unter Zellkultivierungsbedingungen.

Zugabe von Serum und Antibiotikum

Da die Inkubation in FKS-freiem Medium jedoch nach einer gewissen Zeit, durch Mangel an Überlebensfaktoren, zum Absterben der Zellen führt, wurde nach einer Inkubations von 4 h jedes Loch der Sechslöchkulturplatten mit 1 ml Komplett-Medium und zusätzlich je 100 µl Serum und 10 µl Antibiotikum versetzt. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen nach 24 h/48 h/72 h entweder zur RNA-Isolation mit Trypsin/EDTA geerntet oder für die funktionellen Versuche mit Zytostatika versehen.

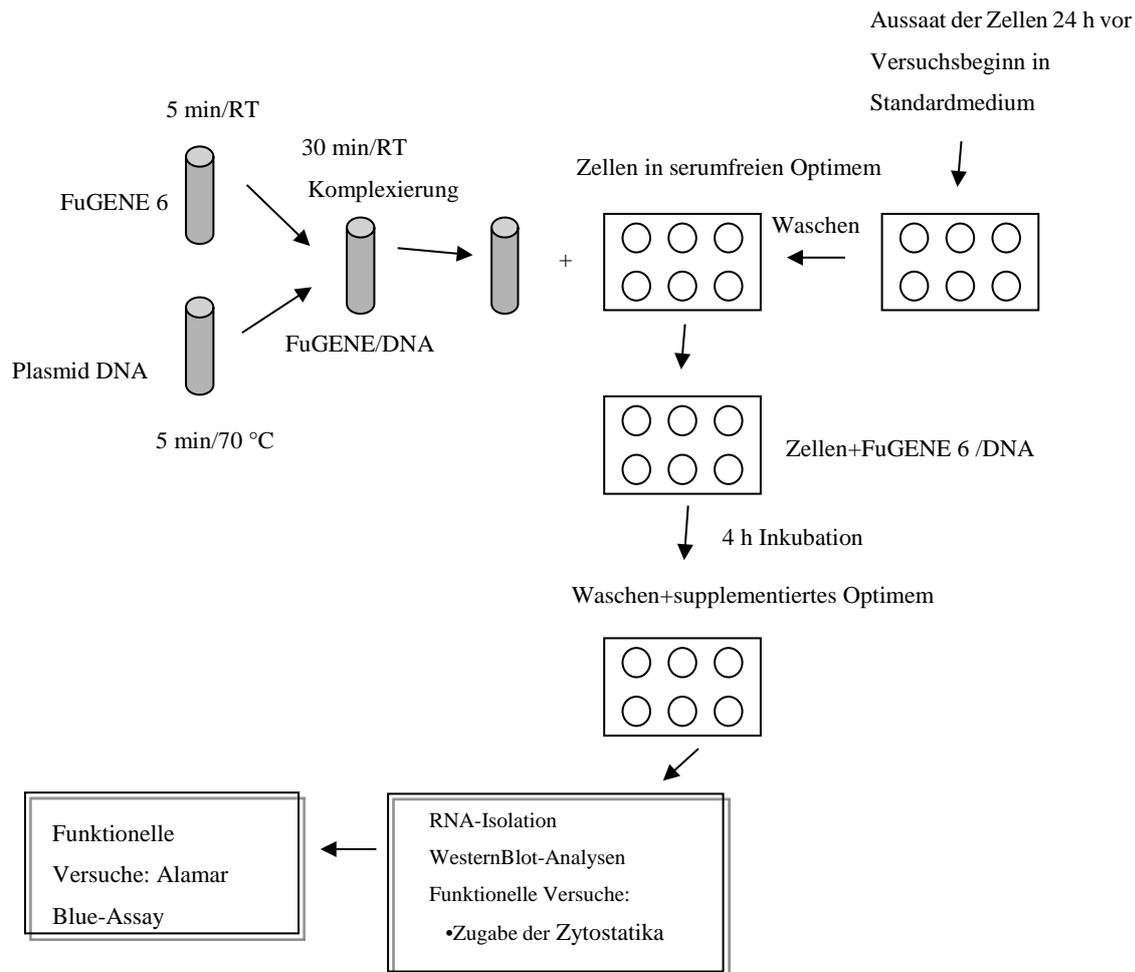


Abb. 2.7: Ablauf der Behandlung der Zellen mit Plasmid-DNA in Kombination mit FuGENE 6; anschließende molekularbiologische Analysen und funktionelle Versuche.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden zur Genexpressionsanalyse

Zur Durchführung der Genexpressionsanalysen wurde zunächst die Gesamt-RNA isoliert. Anschließend wurde eine Real Time (RT)-PCR (TaqMan[®]PCR) durchgeführt und mittels des Abi Prism 7700 (Applied Biosystems, Langen) sequence-detection system (TaqMan[®]) quantifiziert. In dem verwendeten Ein-Schritt-Protokoll der TaqMan[®]PCR erfolgte die Umschreibung in komplementäre DNA (cDNA) mit Hilfe der Reversen Transkriptase (MuLV RT) und die quantitative Amplifikation mit der AmpliTaq Gold[®]Polymerase in einem Schritt. Zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNasen wurde generell mit Handschuhen und RNase freiem Wasser gearbeitet. Es wurden sterile wattierte Pipettenspitzen und sterile Reaktionsgefäße verwendet. Für die RNA-Isolation und die TaqMan[®]PCR wurden räumlich getrennte Arbeitsplätze und Pipettensätze verwendet.

2.2.4.1 Isolierung der RNA

Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurden die konfluenten Zellen mittels Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der X-lochkulturplatten bzw. -Flaschen abgelöst und zentrifugiert. Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit von Qiagen. Prinzipiell wurden hier die Zellen mit einem Guanidinisothiocyanat- und β -Mercaptoethanol-haltigen Puffer lysiert, wobei die Proteine denaturiert und RNasen inaktiviert wurden. Durch Zugabe von 70%-igem Ethanol zum homogenisierten Lysat wurden die Nukleinsäuren gefällt. Nach Bindung der RNA auf der Quarzmembran wurden Kontaminationen mittels Waschpuffer entfernt und die RNA in RNase freiem Wasser eluiert.

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurde folgendes Protokoll verwendet:

Die Zellen wurden mit 350 μ l RLT-Puffer® lysiert und mittels einer 0,5 mm Durchmesser Kanüle homogenisiert. 350 μ l 70%-iger Ethanol wurde hinzugefügt und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die 700 μ l Probe wurde in eine RNeasy mini spin® Säule mit einem 2 ml Sammelgefäß überführt und 15 sek bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, 700 μ l RW1® Puffer auf die Säule gegeben, erneut zentrifugiert (10.000 rpm, 15 sek) und das Filtrat abermals verworfen. Mit 500 μ l RPE® Puffer wurde die Säule durch Zentrifugieren gewaschen und der Durchfluss verworfen. 500 μ l RPE® Puffer wurden in die Säule gegeben, diese 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und das Filtrat mit dem Sammelgefäß verworfen. Die Säule wurde in ein 1,5 ml Sammelgefäß gestellt und die RNA unter Verwendung von 40 μ l RNase-freiem Wasser und einem Zentrifugationsschritt (10.000 rpm, 1 min) isoliert. Das erhaltende Eluat wurde bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.4.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der RNA-Proben wurde photometrisch ermittelt (Gene Quant II, Pharmacia). Bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht im Falle von RNA ein gemessener Absorptionswert von 1 bei einer Schichtdicke von 1 cm ungefähr einer Konzentration von 37 μ g/ml. Zur Messung wurde eine UV-Licht durchlässige Quarzküvette (Ultra-Mikro-Quarzküvette, Bender + Hobein, Ulm) eingesetzt. Das Messvolumen betrug 100 μ l. Als Leerwert und Verdünnungsmittel für RNA-Proben (2:98) diente RNase-freies Wasser. Die Reinheit der RNA-Isolierung wurde anhand des Quotienten aus Absorptionsmessung bei 260 nm (RNA) und 280 nm (Protein) überprüft. Dieser Quotient liegt bei sehr reinen Nukleinsäure-Lösungen zwischen 1,9 und 2,0. Niedrigere Werte zeigen Verunreinigungen durch Proteine oder EDTA an.

2.2.4.3 TaqMan®PCR Technik

Bei der Real Time-PCR handelt es sich um eine PCR-Methode zur Detektion genomischer DNA und cDNA. Hierbei ist, im Unterschied zu einer herkömmlichen PCR durch die Verwendung einer fluoreszierenden Sonde, eine simultane Amplifikation und Detektion des Amplikons möglich. Bei der konventionellen PCR bedeutet der Nachweis der entstandenen PCR-Produkte einen hohen Arbeits- und Zeitaufwand. Deshalb wurde die Entwicklung eines sogenannten homogenen Assays, bei dem die Vervielfältigung sowie der Nachweis des PCR-Produktes simultan in einem Reaktionsgefäß möglich sind, angestrebt. Mit den von Lee et al. 1993 bei Applied Biosystems entwickelten fluorogenen Sonden gelang es, den Verlauf der PCR im Reaktionsgefäß zu verfolgen.

2.2.4.3.1 Prinzip der Real Time-PCR (TaqMan®PCR)

In Abb. 2.8 ist das Prinzip der TaqMan®-Detektion graphisch zusammengefasst. Im ersten Schritt der PCR lagern sich Sonde und Primer sequenzspezifisch an die cDNA an. Die hier eingesetzten Sonden bestehen aus einem Oligonukleotid, dessen 5'-Ende einen fluoreszenten Reporterfarbstoff trägt und dessen 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff markiert ist. Befinden sich beide Farbstoffe in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander, so wird durch Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) das Fluoreszenzsignal des Reporterfarbstoffs unterdrückt. Ist also die Sonde intakt, gibt sie kein Fluoreszenzsignal ab. Erreicht die AmpliTaq Gold Polymerase die an den DNA-Doppelstrang gebundene Sonde, entsteht zunächst eine Y-förmige Sekundärstruktur. Diese aktiviert die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase und die Sonde wird Base für Base hydrolysiert, während das PCR-Produkt vollständig synthetisiert wird. Damit wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher unterbrochen und ein Signal durch den Reporterfarbstoff erzeugt. Dieses Fluoreszenzsignal wird entsprechend der Anreicherung von PCR-Produkt mit jedem PCR-Zyklus stärker. Die Fluoreszenzänderung wird mittels ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems, Langen) erfasst.

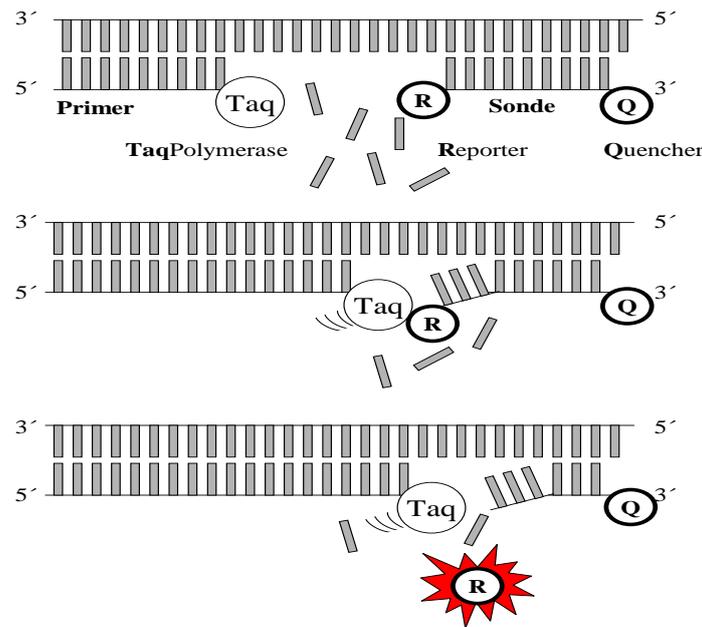


Abb. 2.8: Schematische Darstellung der Sondendegradierung während eines TaqMan®-Laufes. Im ersten Schritt kommt es zur sequenzspezifischen Anlagerung der Sonde und der PCR-Primer an die cDNA. Die räumliche Nähe von Reporter und Quencher verhindert das Fluoreszenzsignal. Danach trifft die 5'→3' exonukleaseaktive Taq DNA Polymerase auf die Sonde und beginnt diese zu hydrolysieren und in Abhängigkeit von der Zahl freigesetzter Reporter-moleküle wächst das Reporter-Signal.

2.2.4.3.2 Reverse Transkription und Amplifikation der cDNA in der Real Time-PCR (TaqMan®PCR)

In dieser Arbeit wurden die Bestandteile des TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mixes von Applied Biosystems verwendet. Aus dem Protokoll der TaqMan®PCR wurde das Ein-Schritt-Protokoll der Gold RT-TaqMan®PCR gewählt, bei welchem die Reverse Transkription und die Amplifikation in einem Reaktionsgefäß zeitlich direkt hintereinander ablaufen. Die Synthese der cDNA aus RNA wurde mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase MuLV-RT (Applied Biosystems) durchgeführt. Diese DNA-Polymerase besitzt sowohl RNA- als auch DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität und synthetisiert an einzelsträngigen RNA-Templaten cDNA. Zur Einleitung der Reversen Transkription wurden in dieser Gold RT-TaqMan®PCR die gleichen Primer wie für die Amplifikation verwendet. Die 18S rRNA wurde als endogene Kontrolle herangezogen, um bei unterschiedlichen Gehalt an Gesamt-RNA einzelner Proben, eine vergleichende Auswertung zu ermöglichen. TaqMan® 18S rRNA Primer und 5' VIC markierte Sonden wurden von Applied Biosystems bezogen und laut der Handhabungsanweisungen des Herstellers angewendet.

Die zur Amplifizierung verwendete AmpliTaq Gold DNA-Polymerase ist eine chemisch modifizierte Form der rekombinanten AmpliTaq (*Thermus aquaticus*) DNA Polymerase. Sie

ist bei Raumtemperatur inaktiv und wird erst in einer der PCR vorgeschalteten Aktivierung (10 min bei 95 °C) in den aktiven Zustand überführt (siehe Tab.2.3-2.5).

Das Ein-Schritt-Protokoll der Gold RT-TaqMan®PCR enthält folgende Schritte:

Tab. 2.2: Ein-Schritt-Protokoll der Gold RT-TaqMan®PCR.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit t	Anmerkungen
Hold	48	30 min	▶ Reverse Transkription
Hold	95	10 min	▶ Aktivierung der AmpliTaq Gold Polymerase
Denaturierung	95	15 sek	▶ Anzahl der Zyklen: 40
Annealing der Primer/Sonde und Polymerasition	60	1 min	

Reaktionsansatz

Alle Messungen wurden als Dreifachansatz durchgeführt.

Tab. 2.3: Reaktionsansatz für eine Probe.

Reagenz	Menge
TaqMan™ Master Mix without UNG	10,0 µl
MultiScribe and RNase Inhibitor Mix	0,50 µl
Primer FW (300 nM)	1,2 µl
Primer RV (300 nM)	1,2 µl
Sonde (100 nM)	0,40 µl
RNA	2,0 µl
20 x 18S rRNA Mix	1 µl
RNase freies Wasser ad	20,0 µl

Die Primer (FW-Vorwärts Primer, RV-Rückwärts Primer) und Sonden wurden von der AG um Prof. H. Krömer freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Primerdesign

Tab. 2.4: Primerdesign.

Primer ABCC 4	Sequenz
FW	5'-CGAGTAGCCATGTGCCATATGA-3'
RV	5'-TGACTATCTGGCCTGTGGTTGTCT-3'
Primer ABCC 5	Sequenz
FW	5'-CACCATCCACGCCTACAATAAA-3'
RV	5'-CACCGCATCGCACACGTA-3'

Sondendesign

Tab. 2.5: Sondendesign.

Sonden	
ABCC 4	5'-FAM-CGGAAGGCACTTCGTCTTAGTAACATGGC-TAMRA-3'
ABCC 5	5'-FAM- CGTTGGTTGTCATCCAGCAGCTCCT -TAMRA-3'

Die klassischen Sonden sind von ihrer chemischen Struktur her folgendermaßen aufgebaut (Abb. 2.9): Die Reporterfarbstoffe FAM (6-Carboxyfluorescein) oder VIC sind kovalent an das 5'-Ende der Sonde gebunden. Der Quencher TAMRA (6-Carboxytetramethylrhodamin) wird über ein Linker-Arm-Nukleotid (LAN) an das 3'-Ende der Sonde gebunden. Essentieller Bestandteil einer TaqMan[®]-Sonde ist, neben dem Referenz- und Quencherfarbstoff, ein 3'-OH-blockierendes Phosphat, das die Extension der Sonde am 3'-Ende während der PCR unterdrückt.

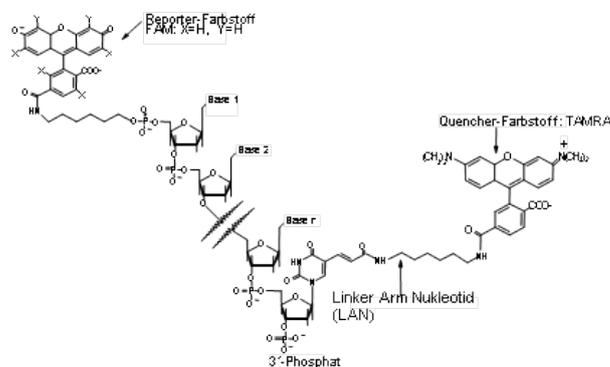


Abb. 2.9: Chemische Struktur einer TaqMan[®]PCR-Sonde.

2.2.4.3.3 Auswertung der Real Time-RT-PCR (TaqMan®PCR)

Werden die nach jedem Zyklus gemessenen Signale (Δ RN-Wert) gegen die Zykluszahl aufgetragen, erhält man eine Darstellung des Reaktionsverlaufes (Amplifikationsdiagramm) der einzelnen Ansätze, wie in Abb. 2.10 dargestellt. Es kann die Hintergrundaktivität der Sonde (Baseline) bestimmt werden. Für eine Auswertung der Fluoreszenzintensität ist es notwendig, dass ihr Anstieg im linearen Bereich liegt. Dies ist der Fall, wenn die Fluoreszenzintensitäten der Ansätze die Baseline um ein zehnfaches übersteigen. Dieser Intensitätswert wird als Schwelle (Threshold), der Zyklus, in dem diese erreicht wird, als Schwellenzyklus (Threshold Cycle [C_T]) bezeichnet.

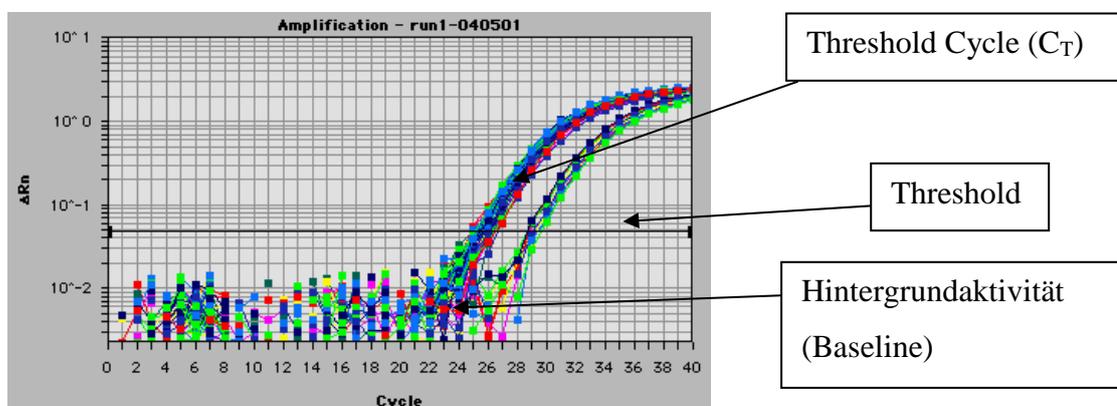


Abb. 2.10: Amplifikationsdiagramm.

Um die Effizienz der Suppressionsversuche zu ermitteln, wurde in dieser Arbeit die $d\Delta C_T$ -Auswertungsmethode gewählt. Hierbei wurde die 18S rRNA als vergleichendes Referenzgen in jeder Probe mit amplifiziert, um trotz unterschiedlicher Gesamt-RNA-Expressionsraten der einzelnen Proben eine vergleichende Quantifizierung zu ermöglichen.

Berechnung der $d\Delta C_T$ Werte:

Zielsequenz C_T – 18S rRNA $C_T = \Delta C_T$ Zielsequenz

Kontroll C_T – 18S rRNA $C_T = \Delta C_T$ Kontrolle

ΔC_T Zielsequenz - ΔC_T Kontrolle = $d\Delta C_T$

Die $d\Delta C_T$ -Werte wurden als negativer Exponent der Basis 2 gesetzt und somit die Kontrolle gleich 1 bzw. 100 % gesetzt.

2.2.5 Gewinnung und Verwendung der siRNAs

2.2.5.1 siRNA-Design

Für die Zusammensetzung der siRNAs gibt es zahlreiche Auswahlkriterien, die auf der Website www.dharmacon.com/sidesign/default.aspx aufgeführt sind und auf der Veröffentlichung von Reynolds, A. *et al.* (2004) (57) basieren.

Die einzusetzende siRNA sollte einen Mindestgehalt an G und C von 30-52 % aufweisen, an Position 15-19 sollten wenigstens drei A/Us, ein A an Position 3 und 19 (sense) und ein U an Position 10 (sense) enthalten. Dahingegen sollten an Position 13 und 19 (sense) weder ein G noch ein C zu finden sein. Außerdem sollten nicht drei gleiche Basen aufeinander folgen und keine internen Wiederholungen vorhanden sein. Außerdem galt zu beachten, dass das Konstrukt am Ende eine Abfolge von fünf T als Terminationssignal (violett markiert im Forward-Strand) für die RNA-Polymerase III enthielt. Somit sollte die siRNA so gewählt werden, dass kein zusätzliches T direkt davor lag, da sonst eine vorzeitige Termination der Polymerisation möglich ist. Das bedeutet, die erste Base des siRNA-Konstrukts (sense) sollte möglichst kein A sein.

Die ausgewählten Sequenzen (siehe 2.1.9.2) wurden von der Firma TIB Mol Biol (Berlin) als Single-Strang-Molekül bezogen. Durch Annealen der Oligos (siehe 2.2.5.2) wurde eine doppelsträngige siRNA hergestellt, die folgende Elemente enthielt:

Forward-Strang:

5'-CGAACCC-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-TTCAAGAGA-
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-TTTTGGAAAC-3'

Reverse-Strang:

5'-TCGAGTCCAAAA-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-TCTCTTGAA-
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-GGGTT-3'

Die farbig markierten Stellen haben eine derartige Basenabfolge, als wären sie zuvor durch die Restriktionsenzyme geschnitten worden (blau durch die Restriktionsendonuklease XhoI und grün durch das Enzym Bsp1191). Dadurch passt sich die siRNA problemlos in den geschnittenen Vektor ein.

Die rot markierten Basen der beiden Stränge sind dabei nicht komplementär und bilden eine sogenannte *hairpin*-Struktur, die nach der Infektion der Zielzellen von Bedeutung ist. Nach der intrazellulären Umwandlung in eine Einzel-Strang RNA durch die RNA-Polymerase bildet sich aufgrund der nichtkomplementären Basen eine doppelsträngige siRNA mit dieser *hairpin*-

Struktur aus. Eine RNase schneidet diese Struktur heraus, so dass am Ende die gewünschte siRNA übrig bleibt.

2.2.5.2 Annealing der siRNA-Moleküle

Der Ansatz für die verschiedenen siRNAs setzte sich aus je 1 µl Oligo-Lösung Forward-Strang (zuvor auf 3 µg/µl verdünnt), 1 µl Oligo-Lösung Reverse-Strang (zuvor auf 3 µg/µl verdünnt) und 48 µl Annealing-Puffer zusammen. Dieser Ansatz wurde im PCR-Cycler folgendem Programm unterzogen (Tab. 2.6).

Tab. 2.6: Protokoll für Annealing der siRNA.

Temperatur (°C)	Zeit (min)
90	4
70	10
62	5
46	5
37	5
25	5
10	5
4	5

Durch das Erhitzen erfolgt eine Ausstreckung der siRNA-Stränge, die sich dann komplementär zusammenlagern. Das langsame Abkühlen bewirkt, dass sich die Doppelstränge nicht mehr auftrennen können.

Diese, nun doppelsträngigen Moleküle, wurden im Ligationsschritt in Plasmide (Vektor V4 und V5) eingefügt (siehe 2.2.5.4).

2.2.5.3 Restriktion der Vektoren

Plasmide sind doppelsträngige, zirkuläre DNA-Moleküle, in die DNA-Fragmente kloniert werden können, um diese Fragmente vielfach kopieren zu können.

Dabei wird die Vektor-DNA mit Restriktionsendonukleasen behandelt. Hierzu wurden die Enzyme XhoI und Bsp119I verwendet. Jeweils 1 µl der Enzyme wurden mit 2 µg der jeweiligen DNA (für V4 und V5 gesondert) und 4 µl Puffer 2*y⁺ versetzt und mit Aqua dest. auf 20 µl ergänzt. Dieser Restriktionsansatz wurde dann für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend

erfolgte die Aufreinigung des gespaltenen Vektors mit dem *Plasmid Purification-Kit*® von Qiagen (Hilden). Je einem Teil des Ansatzes wurde mit 5 Teilen PB-Puffer versetzt und auf eine Säule des *Plasmid Purification-Kit*® gegeben, die in einem Eppendorfgefäß stand. Im anschließenden Zentrifugationsschritt, für 1 min bei 13.000 rpm, bindet die, im Restriktionsansatz enthaltene, DNA an die Matrix der Säule. Der Durchfluss wurde verworfen. Dann wurden in einem Waschschrift 750 µl des PE-Puffers auf die Säule gegeben und wieder zentrifugiert. Nach Entfernen des Durchflusses wurde die Säule noch einmal zum Trocknen zentrifugiert und in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Nun wurde, durch Zugabe von 30 µl Aqua dest., die gereinigte DNA durch erneute Zentrifugation von der Säule eluiert und in dem Eppendorfgefäß aufgefangen. Die gereinigte Vektor-DNA wurde im nächsten Schritt bei der Ligation verwendet.

2.2.5.4 Ligation

Bei der Ligation wird in den geschnittenen, aufgereinigten Vektor (V4, V5) das gewünschte DNA-Fragment mit Hilfe einer Ligase eingefügt.

Der Ligationsansatz ist in Tab. 2.7 aufgeführt.

Tab. 2.7: Reaktionsansatz für eine Probe.

Reagenz	Menge
mit Bsp119I/XhoI geschnittenem, gereinigtem Vektors (entspricht ca. 0,5 µg Vektor-DNA)	7,5 µl
annealte Oligos (doppelsträngige siRNA-Fragmente)	2,0 µl
Ligasepuffer	2,0 µl
T ₄ -Ligase	1,0 µl
Aqua dest.	7,5 µl

Dieser Reaktionsansatz wurde für 2-3 h bei Raumtemperatur inkubiert und, zur Stabilisierung, anschließend für 24 h bei 4 °C aufbewahrt. Erst dann erfolgte die Transformation in *E.coli*.

2.2.5.5 Transformation von *E.coli* mit Plasmiden

Das Einbringen der Plasmide in die Bakterien wird als Transformation bezeichnet. Dazu wurden 50 µl superkompetente *Escherichia coli* (im Vergleich zu normalen *E. coli* - erhöhte

Permeabilität der Zellwand) mit 3 µl des Ligationsansatzes versetzt und zur Inkubation für 2-3 min auf Eis gelagert. Danach wurde das Gemisch für 45 sek einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt. Dadurch wird in der Bakterienzellwand die Porenerweiterung gesteigert und sie wird noch durchlässiger für die Plasmide. Dann folgt eine weitere fünfminütige Inkubation auf Eis. Abschließend wurden 250 µl 1x LB-Medium zugegeben, von denen dann jeweils 100 µl auf Ampicillin-haltige Agar-Platten ausgestrichen wurden. Die Platten wurden danach über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

In den Bakterien können sich die Plasmide unabhängig vom bakteriellen Genom vermehren, was durch den Abschnitt *origin of replication (ori)* auf den Plasmiden ermöglicht wird. Es erfolgt eine Selektion der Bakterien, da sich nur diejenigen E. coli auf dem Ampicillin-haltigen Agar vermehren können, die das Plasmid mit Ampicillin-Resistenz aufgenommen haben. E. coli ohne positives Transformationsergebnis sind in Anwesenheit von Ampicillin nicht lebensfähig.

2.2.5.6 Klon-PCR

Von den über Nacht kultivierten Agar-Platten wurden mehrere isolierte Kolonien mit Hilfe einer jeweiligen Pipettenspitze aus dem Agar gelöst und in jeweils 25 µl PCR-Ansatz getaucht. Alle Pipettenspitzen wurden in separaten Falcon®-Tubes bei 4 °C aufbewahrt.

Tab. 2.8: PCR-Ansatz zur Klonierung.

Reagenz	Menge
Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl
dNTPs (Nucleotide)	1 µl
Taq®Polymerase	0,5 µl
MgCl ₂ 50 mM	1,5 µl
PCR-Puffer	2,5 µl
Aqua dest.	17,5 µl

Die Primer für die Vektoren V4 und V5 waren unterschiedlich, so dass für jeden Vektor ein getrennter Ansatz gemacht wurde.

Primer für V4:

H1_POL_SE1:

5'-CGCGGTCGACATGGAAATCGAACGCTGACGTCATCAACCCGCTC-3'

KO_3UTR_SE:

5'-GCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAG-3'

Primer für V5:

H1_POL_SE1:

5'-CGCGGTCGACATGGAAATCGAACGCTGACGTCATCAACCCGCTC-3'

KO3_UTR_AS:

5'-CCCGGGCGACTCAGTCAATCGGAG-3'

Diese Reaktionsansätze wurden inklusive der Kontrollproben mit dem leeren Vektor im PCR-Cycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg) folgendem Programm unterzogen:

Tab. 2.9: Protokoll für Klon-PCR.

Zeit (min)	Temperatur (°C)	Zyklen
10	95	
1	95	} 4
1	52	
1	72	
1	95	} 29
1	54	
1	72	
10	72	
∞	4	

2.2.5.7 Kontrolle der Ligation

Um zu überprüfen, ob die in den Bakterien vermehrten Plasmide das gewünschte DNA-Fragment enthielten, wurde das PCR-Produkt elektrophoretisch in einem 2%-igen Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel aufgetrennt. Es wurde ein geeigneter Größenstandard (100 bp, 1 kb) und das PCR-Produkt mit dem leeren Vektor mitgeführt.

Die Differenzierung war aufgrund unterschiedlicher Molekülgrößen der PCR-Produkte, die im elektrischen Feld verschieden weit transportiert werden, möglich. Diejenigen Klone, die das gewünschte DNA-Fragment enthielten, wurden zur Weitervermehrung der DNA herangezogen.

2.2.5.8 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Falcon-Tubes mit den positiv-getesteten Bakterienklonen wurden mit 2 ml 1x LB-Medium und 1 µl Ampicillin versetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C in einem Schüttler (250 rpm). Unter Verwendung des *Nucleospin® Plasmid Purification Kit* (Macherey-Nagel, Düren), zur Isolation der Plasmid-DNA, wurde die erhaltene Bakteriensuspension weiter verarbeitet.

Dazu wurden 2 ml der Bakteriensuspension in ein Eppendorfgefäß überführt und eine min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet mit 250 µl Puffer A1 resuspendiert. Danach wurden 250 µl Lysepuffer A2 dazugegeben, um die Zellen zu lysieren, sowie Proteine und chromosomale DNA zu denaturieren. Nach 6-8-maligem Schütteln wurde die Mischung maximal 5 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Neutralisation durch Zugabe von 300 µl des Puffers A3 und erneutem Schütteln. Um etwaige Rückstände zu entfernen, wurde 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde auf eine Säule überführt. Während der folgenden Zentrifugation, bei 13.000 rpm für eine min, wurde die enthaltene DNA an die Säulenmatrix gebunden. Durch Zugabe von 50 µl 50 °C warmen AW-Puffer und 600 µl Puffer A4 erfolgte die Reinigung der gebundenen DNA. Durch wiederholtes Zentrifugieren für zwei min bei 13.000 rpm erfolgte die Trocknung. Im letzten Schritt wurde die DNA von der Säule eluiert. Dieses erfolgte durch Zugabe von 50 µl Aqua dest. und anschließendem Zentrifugieren für zwei min bei 13.000 rpm. Die anschließende Bestimmung des DNA-Gehaltes wird unter 2.2.6.6 beschrieben.

2.2.5.9 Sequenzierung der siRNA-enthaltenden Vektoren

Die isolierte Plasmid-DNA wurde durch eine Sequenzierung mittels Plattensequencer (Applied Biosystems, Weiterstadt) auf die genaue Basenabfolge des eingelagerten siRNA-Konstrukts hin überprüft. Unter Verwendung des sequenzspezifischen Primers und des *Big Dye® Terminator V 3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Weiterstadt) wurde das Fragment in einer Sequenzier-PCR im PCR-Cycler amplifiziert.

Tab. 2.10: Reaktionsansatz zur Sequenzierung der siRNA enthaltenden Vektoren.

Reagenz	Menge
Big Dye®	3 µl
DNA	1 µl
Primer für V4: KO_UTR_AS für V5: KO_UTR_SE	1 µl
Aqua dest.	5 µl

Dieser Ansatz durchlief im PCR-Cycler nachfolgendes Programm (Tab. 2.11).

Tab. 2.11: Protokoll zur Sequenzierung der siRNA enthaltenden Vektoren.

Zeit	Temperatur (°C)	Zyklen
10 sek	95	} 25
5 sek	50	
4 min	60	
∞	4	

Nach erfolgter PCR wurden zu dem PCR-Produkt (10 µl) 75 µl Ethanol (95 % (v/v)) und 3 µl Natriumacetat-Lösung (3 M) gegeben. Die Lösung wurde kräftig gemischt (vortex) und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation, für 20 min bei 13.000 rpm, wurde die Flüssigkeit über dem Pellet quantitativ entfernt. Das Pellet wurde mit 250 µl Ethanol (70 % (v/v)) gewaschen und erneut für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach dem Entfernen der Flüssigkeit wurde das Pellet für 10 min im Speed Vac® getrocknet. Die Wiederaufnahme des Pellets erfolgte in 3 µl Dextran-Blue-Lösung mit anschließender Denaturierung für 2 min bei 90 °C. Zur Hemmung der Renaturierung wurden die Proben, bis zum Auftragen in die Taschen des Sequenziergels, auf Eis gelagert.

Ausgewertet wurden die sequenzierten Proben mit Hilfe von www.pubmed.de (NCBI, BLAST spezial). In dem Programm „Align two sequences“ wurden zum einen die ermittelten Sequenzen der Proben eingelesen und zum anderen die Sequenzen der ausgewählten siRNAs auf Übereinstimmung verglichen. Anschließend wurden die Sequenzen mit dem Programm *Chromas* (Version 2.31 von Technelysium Pty Ltd, Australien) auf die genaue Basenabfolge hin überprüft.

Die Proben, die eine 100%-ige Übereinstimmung mit den vorgegebenen siRNA-Sequenzen hatten, wurden zur Weitervermehrung der Plasmid-DNA herangezogen.

2.2.5.10 Vervielfältigung der Plasmid-DNA

Von den Bakterienkulturen, deren Plasmide eine Basensequenz mit 100%-iger Übereinstimmung mit den zugehörigen siRNA-Sequenzen aufwiesen, wurden 50 µl in 100 ml 1x LB-Medium, mit 100 µl Ampicillin, überführt und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit Hilfe des *Qiagen Midi Kit*[®] (Qiagen, Hilden) isoliert und gereinigt. Dazu wurde die Bakteriensuspension für 15 min bei 6.000 rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 4 ml des RNase-haltigen Puffer A1 wieder aufgenommen und mit 4 ml Puffer A2 versetzt. Nachfolgend sechsmal vorsichtig geschwenkt und maximal für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zellyse und Denaturierung von chromosomaler DNA und Proteinen wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 ml Puffer A3 gestoppt. Nachdem die Proben 15 min auf Eis inkubiert wurden, folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 13.000 rpm und 4 °C. Währenddessen wurde die Säule mit 4 ml Puffer QBT equilibriert. Nun wurde die überstehende Lösung von den entstandenen Präzipitaten dekantiert und auf die Säule gegeben. Die enthaltene DNA bindet so an die Säulenmatrix. Nach dem Waschen mit 2 x 10 ml Puffer QT, wurde die DNA durch Zugabe von 5 ml Puffer QF von der Säule gelöst und in ein neues Falcon[®] Tube überführt. Es folgte die Fällung mit 3,5 ml Isopropylalkohol aus der Lösung. Anschließend wurde erneut 30 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 2 ml Ethanol (70 % (v/v)) gewaschen. Nach Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C wurde wieder der Überstand entfernt, das Pellet an der Luft getrocknet und in 100 µl Aqua dest. resuspendiert. Abschließend wurde der DNA Gehalt der Proben wie unter 2.2.6.6 beschrieben bestimmt und die Proben bei -20 °C gelagert.

2.2.6 Virale Transfektion

2.2.6.1 Virusproduktion

Die verwendete Verpackungszelllinie GP2-293 (Abb. 2.11) ist eine auf HEK 293 basierende Zelllinie, die am Tag vor der Transfektion mit $4-5 \times 10^6$ Zellen in eine 25 cm² Kulturflasche mit 5 ml DMEM- high glucose-Medium ausgesät wurden.

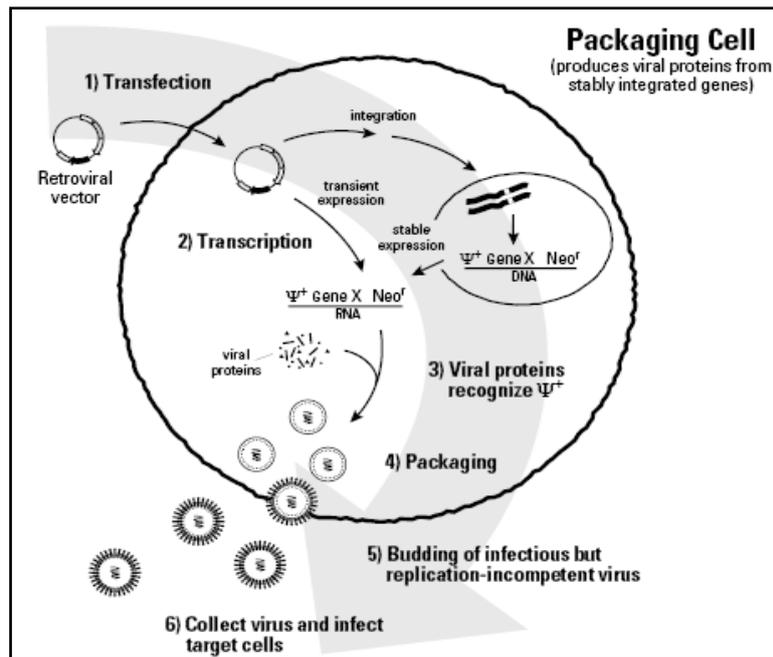


Abb. 2.11: Virusproduktion in Verpackungszelllinien. Die *gag*- und *pol*-Gene, die für die Produktion der Viren benötigt werden, sind im Genom dieser Zellen enthalten. Der Vektor stellt die Resistenzgene zur Verfügung und der pVSV-Vektor codiert für das *env*-Gen, die in das Zellgenom der Verpackungszelllinie eingebaut werden. Außerdem enthält der Vektor das Verpackungssignal ψ und eine U3-Deletion, die zur Selbstinaktivierung des Vektors führt, sobald der Vektor ins Zellgenom der Zielzellen eingebaut wird.

Tab. 2.12: Reaktionsansatz zur Virusproduktion.

Reagenz	Menge
pVSV-Vektor	15 μ g
Vektor V4 oder V5	15 μ g
Natriumacetat-Lösung 3 M	10 μ l
Aqua dest.	Ad 50 μ l
Ethanol (100 % V/V)	125 μ l

Für den Kontrollansatz wurde der pVSV-Vektor weggelassen (Tab. 2.12). Es wurden die Volumina, die den oben angegebenen Mengen entsprechen, zusammenpipettiert, gemischt und für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen, das entstandene Pellet mit 125 μ l Ethanol (70 % (v/v)) gewaschen und wieder bei den gleichen Parametern zentrifugiert. Anschließend wurde der Alkohol entfernt, das Pellet getrocknet und in 25 μ l Aqua dest. wiederaufgenommen. Die Suspension wurde zu einer Mischung aus 200 μ l Aqua dest. und 25 μ l Calciumchlorid-Lösung (2 M) gegeben. Unter vorsichtigem Schütteln wurde tropfenweise 250 μ l 2x HeBS zugefügt.

Von den Zellen wurde das alte Medium gegen 10 ml neues Medium, das mit 12,5 μ l Chloroquin-Lösung (10 mM) versetzt wurde, ausgetauscht. Ohne den Zellrasen zu berühren wurde nun die DNA-Lösung dem Medium zugefügt. Die Zellkulturflaschen wurden dann bei

37 °C inkubiert. Nach 8 h wurde das alte Medium abgenommen, die Zellen dreimal mit 5 ml Medium (ohne FCS und Antibiotika) gewaschen und wieder 5 ml Komplettmedium zugegeben. Die Zellen wurden zur Fortsetzung der Inkubation für weitere 24 h bei 37 °C und weitere 24 h bei 32 °C aufbewahrt. Abschließend wurden die Zellen der Virusernte zugeführt.

2.2.6.2 Virusernte

Zur Vorbereitung der Virusernte wurden die Beckmann Zentrifugenröhrchen (Polyallomer Centrifuge Tubes No. 331372) und die Verschlusschrauben der Rotoreinsätze des Rotors TI 41 SW mit Ethanol (75 % (v/v)) sterilisiert.

Von den 25 cm² Kulturflaschen wurde nun das Medium abgesaugt und durch einen Filter (45 µm) in ein Falcon[®]-Tube filtriert. Der Virusüberstand wurde genau gleichmäßig mit 4 ml pro Tube verteilt. Die Röhrchen wurden in die Rotoreinsätze gestellt, die mit sterilen Stopfen verschlossen, und bei 4 °C bei 50.000 g für 90 min in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig (*Viruspellet nicht sichtbar*) abpipettiert und verworfen. Zum Resuspendieren des Viruspellets wurden 90 µl TNE-Puffer steril in Falcon[®]-Tubes gegeben und die Suspension anschließend über Nacht bei 4 °C gelagert.

Danach wurde die Suspension zu je 30 µl in sterile Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.6.3 Infektion der H4IIE Zellen

Zur Infektion der H4IIE Zellen wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in einer 25 cm² Kulturflasche in 5 ml DMEM-Medium kultiviert. Nach 24 h wurde das Kulturmedium abgenommen und durch neues Medium, unter Verwendung eines 45 µm Filters, ersetzt. Das Medium enthielt pro ml 1 µl sterile Polybrene-Lösung (6 µg/µl) und 30 µl aliquotierte, aufgetaute Virussuspension. Danach wurden die Zellen zur Inkubation für 24 h bei 32 °C im Brutschrank gelagert, um sie anschließend wieder bei 37 °C zu kultivieren.

Am zweiten Tag nach der Infektion, waren bereits einige grün fluoreszierende Zellen, Indikator für eine erfolgreiche Transfektion, unter dem Fluoreszenzmikroskop erkennbar. Bei einer Konfluenz von ca. 80 %, wurden die Zellen abtrypsiniert und auf drei 25 cm² Kulturflaschen in jeweils 5 ml Medium aufgeteilt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die infizierten H4IIE Zellen auf 75 cm² Kulturflaschen verteilt und mit 4 µl Hygromycin (50 mg/ml) pro ml Medium selektiert.

Es wurden auch Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren (siehe 2.2.3.3) Von jeder weiteren Passage der transfizierten Zellen wurde ein Aliquot abgenommen und als Zellpellet für weitere Untersuchungen aufbewahrt.

2.2.6.4 Kontrolle des Transfektions- und Infektionserfolges

Um überprüfen zu können, ob die Transfektion erfolgreich war, wurde bei der Virusproduktion ein zusätzlicher Ansatz transfiziert. Dieser enthielt einen Vektor mit pEGFP-C1, aber keinen pVSV-G-Vektor. Somit wäre keine vollständige Virenproduktion möglich. Da die Zellen, die mit diesem Ansatz versetzt wurden, nicht der S2-Sicherheitsstufe unterlagen, konnten die entsprechenden Zellkulturflaschen zur Kontrolle unter dem Fluoreszenzmikroskop genutzt werden.

Die Zellen, die das Plasmid in ihr Genom integriert hatten, zeigten eine grüne Fluoreszenz. Das Plasmid enthält eine Region, die für ein grün fluoreszierendes Protein (pEGFP-C1) codiert, welches die transfizierten Zellen dann exprimieren. Je stärker die Fluoreszenz, desto effizienter war die Transfektion.

Zur Vorbereitung der Kontrolle der viralen Infektion der H4IIE Zellen, wurden in 6-Lochplatten, die Löcher mit Deckgläschen bestückt. Darin wurden die infizierten Zellen ausgesät. Nach 72 h wurde das Medium von den Zellen entfernt und zweimal mit je 1 ml PBS gespült. Die Zellen wurden auf den Deckgläschen mit je 1 ml Paraformaldehyd für 15 min fixiert. Danach folgten drei Waschschrte für je 5 min mit je 1 ml PBS. Die Deckgläschen wurden aus den Löchern entfernt, an der Luft getrocknet und anschließend mit 30 µl *DAKO Fluorescent Mounting Medium*, dem 1:1.000 TOTO (zur Färbung des Zellkerns) zugesetzt wurde, eingebettet.

Nach einer Einwirkzeit von 24 h konnte die Fluoreszenz an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung und einer Anregung bei 488 nm ausgewertet werden.

2.2.6.5 Spezielle Isolation der Gesamt-RNA aus Zellen

Zur Präparation der Gesamt-RNA wurde den auf 6-Loch-Platten kultivierten Zellen nach dem Entfernen des Kulturmediums 250 µl *peqGOLD RNAPure*-Lösung zugefügt und die, durch kräftiges Auf- und Abpipettieren, entstandene Suspension in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur zur Dissoziation der Nukleotidkomplexe wurden 125 µl Chloroform hinzugegeben und 15 sek kräftig geschüttelt. Nach weiteren 5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde durch Zentrifugation (13.000 rpm, 5 min) eine

Phasentrennung der Proben erreicht. Die untere, gelbe stellt die Chloroform-Phenol-Phase dar, die mittlere Interphase enthält die Zelltrümmer und Proteine und die obere, klare und wässrige, Phase enthält die RNA. Diese obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 250 µl Isopropylalkohol erfolgte eine zehnmünütige Inkubation bei Raumtemperatur, gefolgt von einem Zentrifugationsschritt (13.000 rpm bei 4 °C, 10 min). Anschließend wurde der Isopropylalkoholüberstand abgenommen und das RNA-Pellet zweimal mit 400-500 µl 75%-igem (v/v) Ethanol gewaschen. Nach weiteren Zentrifugationsschritten wurde der Alkoholüberstand sorgfältig entfernt, das Pellet an der Luft getrocknet und in 50 µl RNase-freiem Wasser durch Vortexen resuspendiert. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.2.6.6 Bestimmung des RNA/DNA-Gehaltes

Die Quantifizierung der RNA- oder DNA-Proben erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Nukleinsäuren besitzen ein aromatisches Ringsystem, das elektromagnetische Strahlung im Bereich von 250-270 nm absorbiert. Deshalb kann man durch die Messung der Extinktion in einem UV/VIS-Messgerät und Zuhilfenahme des Lambert-Beerschen-Gesetzes die Konzentration der RNA oder DNA berechnen.

Um zusätzlich die Reinheit der Proben zu ermitteln, wurde die Absorption bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) gemessen. Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.6.7 Zytotoxizitätstest Alamar Blue

Der Alamar Blue-Assay ermöglicht eine Bestimmung der metabolischen Aktivität der Zellen. Beim Alamar Blue-Reagenz handelt es sich um einen nicht toxischen Abkömmling des MTT (Tetrazolinumsalz), einem Redox-Indikator. Proliferierende Zellen überführen die blaue oxidierte Form in die reduzierte rote Form durch die in der Zelle vorhandenen Reduktionsmittel. Da die Absorptionsspektren der oxidierten (blauen) und der reduzierten (roten) Form des Alamar Blues überlappen, wird die resultierende Absorption bei zwei verschiedenen Wellenlängen an einem Wallac Victor Fluoreszenzphotometer gemessen und kann als Maß für die Zellvitalität gewertet werden.

Durchführung des Alamar Blue-Assays

Der Assay wurde als Vierfachbestimmung in 96-Loch-Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Zellen werden nach der Inkubation mit Zytostatika mit jeweils 10 µl Alamar Blue-Reagenz

versetzt und 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Absorption der Löcher wird bei einer Wellenlänge von 560/595 nm an einem Wallac Victor Fluoreszenzphotometer gemessen.

2.2.7 Proteinanalytische Methoden

2.2.7.1 Isolation zytosolischer und membranständiger Proteine

Alle angefertigten Biopsieproben wurden mit Hilfe von Mörser und Pistill im flüssigen Stickstoff zermahlt und in ein Eppendorfgefäß mit 500 µl kaltem Lyse-Puffer überführt. Daraufhin wurden die Proben für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nun erfolgte eine Aufteilung des Überstandes. So wurden zum einem 20 µl des Überstandes mit 80 µl A. dest versetzt und der Proteinbestimmung (siehe 2.2.7.2) zugeführt und zum anderen wurden 500 µl des Überstandes mit 250 µl Probenpuffer bestehend aus 225 µl Lämmli-Puffer und 25 µl einer 1 M DTT-Lösung gemischt, die für die Western Blot Analyse benötigt wurden. Nachfolgend wurden die Proben zur vollständigen Denaturierung der Proteine 10 min auf 95 °C erhitzt und anschließend bei -20 °C bis zur Western Blot Analyse (siehe 2.2.7.4) gelagert.

2.2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des BCATM Protein *assay* Kit (Pierce, Rockford, USA). In alkalischer Lösung können Proteine Cu²⁺ zu Cu⁺ reduzieren. Diese reduzierten Ionen reagieren dann mit BCA (Bicinchoninsäure) zu einem farbigen Komplex (58) der wiederum photometrisch gemessen werden kann. Für jede Bestimmung wurde eine Verdünnungsreihe einer BSA-Lösung (1 mg/ml) mit 0, 10, 20, 30, 40 und 50 µg Protein/ml angesetzt und die Proben 1:5 mit A. dest verdünnt. In einer Doppelbestimmung wurden jeweils 200 µl Färbereagenz, bestehend aus einem Teil einer 4%-igen Kupfer-II-Sulfat-Lösung und 50 Teilen einer 1 %-igen BCA-Lösung, pro Loch einer Mikrotiterplatte mit 10 µl der Probe versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend konnte die Extinktion bei 562 nm mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Lesegerätes gemessen werden.

2.2.7.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (Diskontinuierliche SDS-Page)

Für die Western Blot Analyse müssen die Proteine zunächst elektrophoretisch aufgetrennt werden. Hierzu dient die vertikale diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page), eine analytische Methode, die Stoffgemische nach der Molekülmasse im elektrischen Feld auftrennt. Das Trennmedium ist das diskontinuierliche Gel auf Polyacrylamidbasis und zusätzlich kommt SDS (Natriumdodecylsulfat) zum Einsatz. SDS ist ein anionisches Detergenz, welches die

Eigenladungen von Proteinen überdeckt, sodass diese Proteine eine konstant negative Ladung aufweisen. Dies führt zur gegenseitigen Abstoßung und zur Linearisierung der Proteine bei der Denaturierung durch Erhitzen. Des Weiteren bilden sich sogenannte SDS-Protein-Komplexe. Diese Komplexe wandern im elektrischen Feld weitgehend unabhängig der Eigenladung der Proteine zur Anode und werden so aufgrund des Molekularsiebeffektes im Polyacrylamid-Gel nach der Molekularmasse aufgetrennt. Kleine Proteine wandern relativ leicht durch das Gel, wohingegen größere Proteine eher zurückgehalten werden und langsamer sind. Am Ende des Vorgangs sind alle Proteine nach der Größe sortiert und können sichtbar gemacht werden.

Für die SDS-Page wurden Gel-Kassetten verwendet. Als erstes wurde das Trenngel, entsprechend Tab. 2.13 hergestellt und zwischen zwei fettfreie Glasplatten gegossen. Um eine gleichmäßig gerade Oberfläche zu gewährleisten wurde dies mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, konnte das Isopropanol entfernt werden. Anschließend wurde das Trenngel nun mit dem Sammelgel überschichtet und der Taschenkamm eingeführt. Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels wurde nun die Gelkassette in einer vertikalen Elektrophoresekammer fixiert und die Kammer mit Tankpuffer befüllt. Der Kamm wurde entfernt und die Probenaschen wurden zur Entfernung von Gelresten gespült. Die Proteinproben wurden wie oben beschrieben behandelt und jeweils 50 µg pro Probe in die Taschen des Sammelgels gegeben. Die Elektrophorese wurde bei 80 V gestartet und ab Erreichen des Trenngels bei 100 V für ca. 1,5 h durchgeführt. Das Molekulargewicht der Proteine wurde mittels Proteinmarker (3 µl) abgeschätzt.

Tab.2.13: Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel

	Trenngel		Sammelgel
	6 %	10 %	5 %
H ₂ O [ml]	5,3	4	2,1
30 % Acrylamid [ml]	2	3,3	0,5
0,5 M Tris-HCl pH = 6,8 [ml]		-	0,38
1,5 M Tris-HCl pH = 8,8 [ml]	2,5	2,5	-
10 % (w/v) SDS [µl]	100	100	30
10 % (w/v) AMPS [µl]	100	100	30
TEMED [µl]	8	4	3

2.2.7.4 Western Blot Analyse von Proteinen

Die Western Blot Analyse dient zur Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran. Die zu untersuchenden Proteine können dann über unterschiedliche Reaktionen nachgewiesen werden. Hier wurde eine hydrophobe Nitrocellulosemembran verwendet, auf die elektrophoretisch aufgetrennte Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes übertragen und immobilisiert wurden. Beim Transfer bleibt die elektrophoretische Auftrennung nach Molekularmasse erhalten. Zum Transferpuffer wurde Methanol zugegeben, was zu einer Aktivierung der Proteinbindungsstellen auf der Membran führt. Die transferierten Proteine können anschließend mit Hilfe einer Antigen-Antikörper-Reaktion detektiert werden. Die Membran wird mit einem Primärantikörper gegen das gesuchte Antigen inkubiert und ungebundene Antikörper werden durch mehrmaliges Waschen entfernt. Die Detektion der Proteine erfolgt anschließend durch einen mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper, der das im Färbereagenz enthaltene Luminol oxidiert. Die dabei entstehende Chemilumineszenz kann nun mittels eines Röntgenfilms sichtbar gemacht und quantifiziert werden.

2.2.7.4.1 Nass-Blot Verfahren

Um die Proteine sorgfältig aus der Gelmatrix auf die Nitrocellulosemembran zu übertragen, wurde das Verfahren des Nass-Blots nach Towbin verwendet (59). Dazu wurden sechs Blätter Whatman Filterpapier und eine Nitrocellulosemembran in Transferpuffer getränkt und, wie in Abb. 2.4 dargestellt, in einer Art Sandwich luftblasenfrei angeordnet. Der gesamte Stapel wurde anschließend in einen Rahmen gespannt und in eine, mit kaltem Transferpuffer befüllten, Elektrophoresekammer platziert. Der Transfer erfolgte bei 100 V für 1,5 h. Um eine vermehrte Wärmeentwicklung zu verhindern, wurde, während des gesamten Prozesses, die Kammer mit Eis gekühlt. Um die Vollständigkeit und die Qualität des Blottens zu überprüfen, wurden, nach Beendigung des Transfers, die Proteine auf der Membran mit Ponceau S reversibel angefärbt. Die gefärbte Membran wurde zur Dokumentation und Analyse eingescannt und anschließend durch mehrmaliges Waschen mit TBST wieder entfernt.

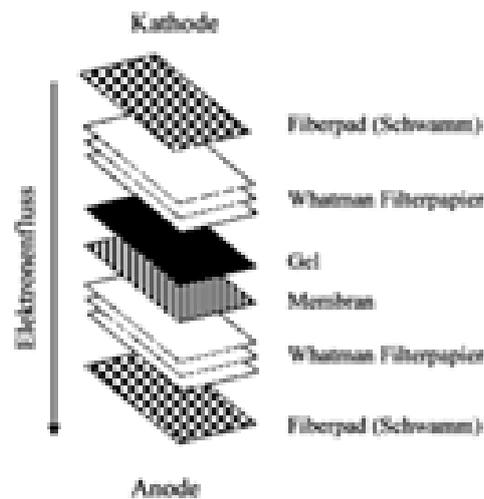


Abb. 2.12: Schematischer Aufbau eines Nassblottes.

2.2.7.4.2 Immundetektion

Die Proteinbanden wurden nun mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert. Spezifische Antikörper können an passende Proteinbanden auf der Membran binden. Dafür wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in 5 % Milchpulver (in TBST gelöst) inkubiert, um die unbelegten Stellen zu blockieren. Daraufhin wurde sie fünfmal 5 min mit TBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper (entsprechende Verdünnung des Antikörpers in 4 ml 5 % BSA/TBST) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zum Entfernen des ungebundenen Primärantikörpers wurde die Membran dann dreimal 5 min mit TBST gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 60 min mit dem Meerrettich-Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper (1:5.000 in 5 % Milchpulver/TBST). Zur Erkennung der gebundenen Antikörper wurde die Membran erneut gewaschen und anschließend für 2 min mit dem ECL Western Blotting *LumiGlo* inkubiert. Die Membran wurde in einer Filmkassette fixiert und ein Röntgenfilm aufgelegt, um die bei der Umsetzung des Färbereagenzes entstehende Lumineszenz zu detektieren. Am Ende wurde der Film entwickelt und fixiert. Daraufhin getrocknet, eingescannt und ausgewertet.

2.3 Statistik

Für die statistische Analyse und Darstellung der Ergebnisse wurde SigmaStat/SigmaPlot und Prism5 verwendet. Es wurden die Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM, *standard error of the mean*) bestimmt. Die Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen wurden mittels Ein-Weg-Varianzanalyse (analysis of variance, one way ANOVA) mit anschließender post hoc-Testung mit Tukey's Multiple Comparison Test analysiert.

3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, potentiell kardioprotektive Substanzen in speziellen Ischämie/Reperusionsmodellen zu untersuchen und die zugrunde liegende Signalkaskade zu identifizieren. Hierfür stand zum einen die Untersuchung der Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (sGC) durch BAY 58-2667 in der frühen Phase der Reperfusion, sowie die Signalweiterleitung in der Zelle im Mittelpunkt. Es wurde die Rolle des intrazellulären cGMP, welches ein wichtiger Mediator in der Prä- und Postkonditionierung darstellt, während der frühen Phase der Reperfusion hinterfragt und mittels Radioimmunoassay gemessen. Des Weiteren sollte neben der Steigerung der cGMP-Produktion und der Inhibition dessen Abbaus ein Ansatz etabliert werden, die intrazelluläre cGMP Konzentration zu steigern bzw. über einen gewissen Zeitraum konstant zu halten. Die membranständigen Transporter ABCC 4 und ABCC 5 gelten als Effluxtransporter für zyklisch Nukleotide wie cAMP und cGMP (60). Um einen möglichen Effekt der beiden Transporter analysieren zu können, sollte ein siRNA-vermittelter *knock down* von ABCC 4 und ABCC 5 erzielt werden. Hierzu wurden nach bestimmten Kriterien, spezifisch gegen ABCC 4/5, gerichtete siRNAs ausgewählt, mit deren Hilfe ein ABCC 4 und ABCC 5 - *knock down* in Zellen durchgeführt werden sollte.

3.1 BAY 58-2667

In dieser Studie wurde der kardioprotektive Effekt von BAY 58-2667, einem potentiellen sGC Aktivator, in *ex-vivo* perfundierten Rattenherzen im Ischämie/Reperusionsmodell getestet.

Des Weiteren wurde der Wirkungsmechanismus von BAY 58-2667 mit Hilfe von bekannten Inhibitoren der schützenden Signalkaskade untersucht.

3.1.1 Bestimmung der Infarktgröße *ex-vivo* perfundierter Rattenherzen nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von BAY 58-2667 während der Reperfusion

In dieser Arbeit wurde die potentiell kardioprotektive Substanz BAY 58-2667 im Ischämie/Reperusionsmodell untersucht und dessen Wirkungsmechanismus näher charakterisiert. Hierzu wurden zunächst unterschiedliche Konzentrationen von BAY 58-2667 in isolierten Rattenherzen perfundiert und die resultierende Infarktgröße bestimmt.

BAY 58-2667 reduzierte in einer Konzentration von 50 nM, zugeführt während der Reperfusion, die Infarktgröße von 29,2 % \pm 1,6 % (Infarktgröße als Prozent vom Risikoareal)

in der Kontrolle auf $16,4 \% \pm 5,3 \%$ ($p < 0,001$ vs. korrespondierende Kontrolle). Die Ergebnisse sind in Abb. 3.1 graphisch dargestellt und in Tab. 7.1 im Anhang zusammengefasst.

Zusätzlich wurden zwei weitere BAY 58-2667 Konzentrationen (1 nM und 1 μ M) in isolierte Rattenherzen perfundiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass 1 μ M BAY 58-2667 ebenfalls einen signifikanten Myokardschutz hervorruft und die geringere Konzentration zu keiner signifikanten Reduktion der Infarktgröße führt.

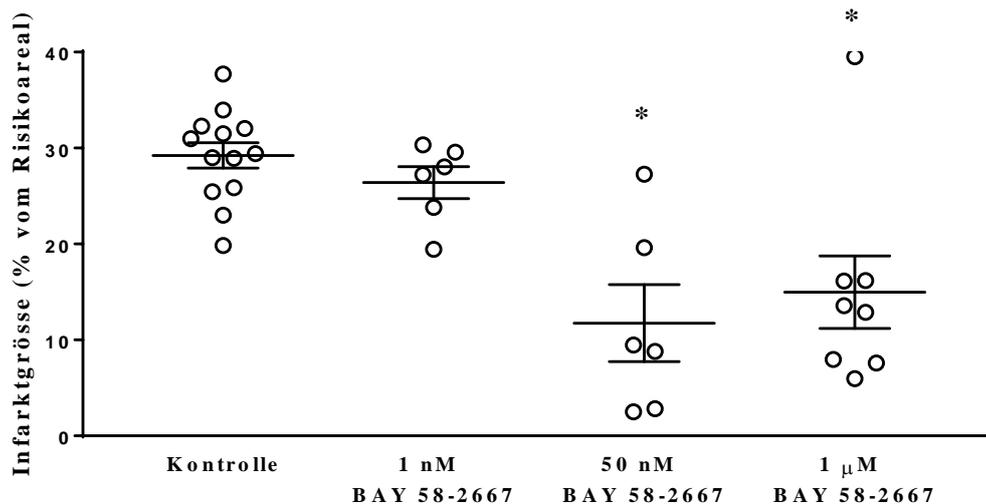


Abb. 3.1: Kardioprotektiver Effekt von BAY 58-2667 in isolierten Rattenherzen. Die Behandlung mit BAY 58-2667 (50 nM und 1 μ M) führt zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße ($p^* < 0,001$ vs. Kontrolle). 1nM BAY 58-2667 hat keinen Einfluss auf die Infarktgröße. Dargestellt sind die Infarktgrößen als Prozent vom Risikoareal der einzelnen Herzen. (Mittelwert \pm SEM).

3.1.2 Klärung des Wirkmechanismus von BAY 58-2667 mittels Infarktgröße *ex-vivo* perfundierter Rattenherzen

Um den schützenden Mechanismus von BAY 58-2667 klarer darzustellen, wurden den *ex-vivo* perfundierten Rattenherzen zusätzlich Blocker, die spezielle Elemente in der postulierten intrazellulären Signalkaskade modulieren, hinzugeben.

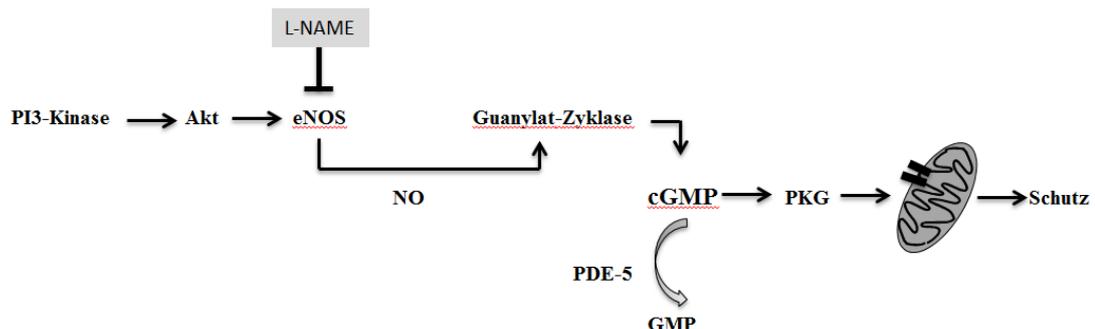


Abb. 3.2: Eingriffspunkt des eNOS-Inhibitors L-NAME in den postulierten Signalweg.

Hierfür wurde zunächst der selektive eNOS Inhibitor L-NAME (200 μ M) zusammen mit BAY 58-2667 während der Reperfusion in isolierten Rattenherzen perfundiert (Abb. 3.2). Die durch BAY 58-2667 vermittelte Reduktion der Infarktgröße konnte nicht durch L-NAME aufgehoben werden. Die Infarktgröße war signifikant kleiner als in der korrespondierenden Kontrollgruppe (BAY 58-2667 + L-NAME: 15,4 % \pm 2,8 %, $p < 0,001$ vs. korrespondierende Kontrolle), unterschied sich jedoch nicht signifikant von der BAY 58-2667. Der Inhibitor L-NAME allein hatte keinen Effekt auf die Infarktgröße. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.3 graphisch dargestellt und in Tab. 7.2 im Anhang zusammengefasst.

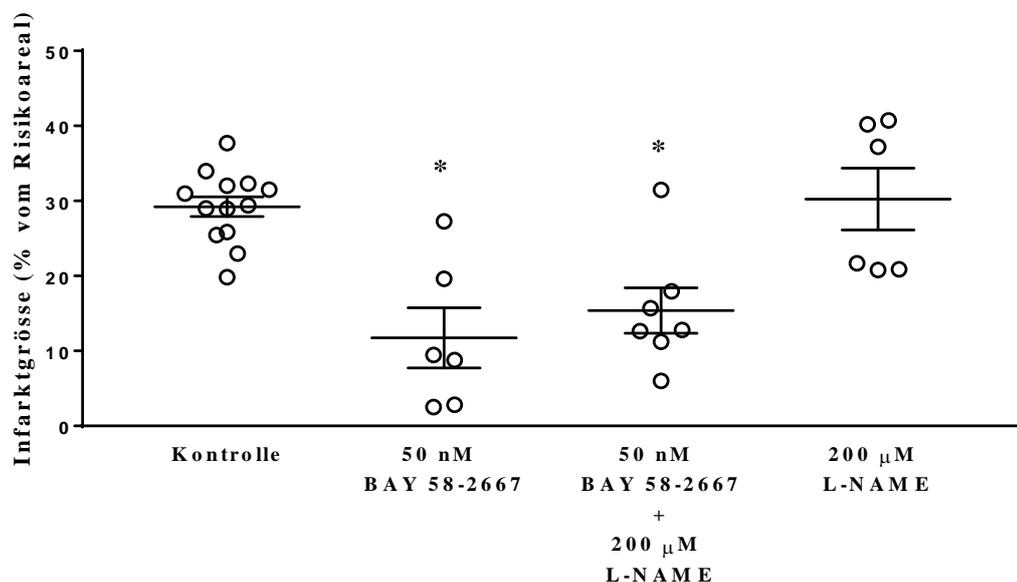


Abb. 3.3: Effekt des eNOS Inhibitor L-NAME auf die kardioprotektive Wirkung von BAY 58-2667. Die Zugabe von L-NAME hebt die signifikante Reduktion der Infarktgröße durch BAY 58-2667 nicht auf. (* $p < 0,005$ vs. korrespondierende Kontrolle). Der Inhibitor allein bewirkt keine Reduktion der Infarktgröße. Dargestellt sind die Infarktgrößen als Prozent vom Risikoareal der einzelnen Herzen (Mittelwert \pm SEM).

Protein Kinase G (PKG) wird in der postulierten Signalkaskade der Postkonditionierung nach Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase aktiviert, welches zum Myokardschutz führt. In dieser Studie wurde deshalb der Einfluss des PKG Inhibitors KT-5823 auf den BAY 58-2667 vermittelten Myokardschutz untersucht (Abb.3.4).

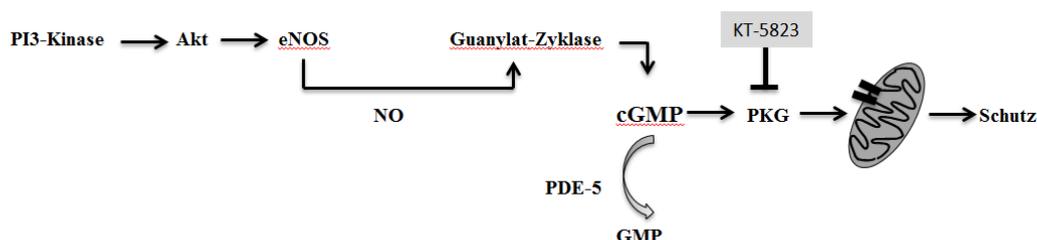


Abb. 3.4: Eingriffspunkt des PKG-Inhibitors KT-5823 in den postulierten Signalweg.

Hierfür wurde der PKG Inhibitor KT-5823 zusammen mit BAY 58-2667 während der Reperfusion verabreicht. Es zeigte sich eine Aufhebung des, durch BAY 58-2667, vermittelten Myokardschutzes ($29,8 \% \pm 1,7 \%$, n.s. vs. korrespondierende Kontrolle). Der Inhibitor allein hatte keinen Einfluss auf die Infarktgröße (32). Die Ergebnisse sind in Abb. 3.5 graphisch dargestellt und in Tab. 7.2 im Anhang zusammengefasst.

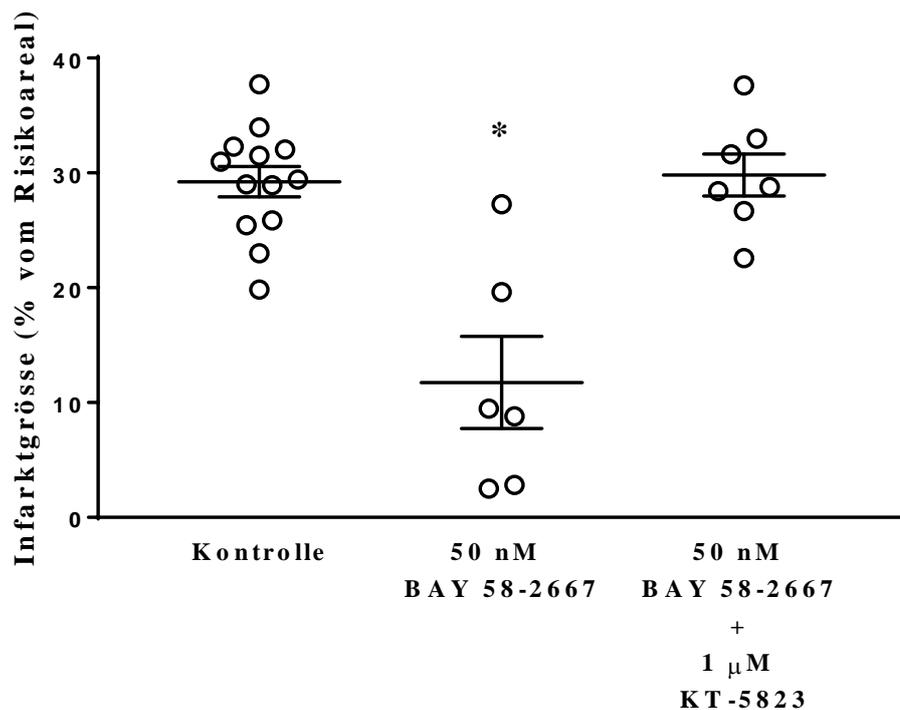


Abb. 3.5: Effekt der Inhibition von PKG auf die kardioprotektive Wirkung von BAY 58-2667. Die Zugabe von KT-5823 hebt die signifikante Reduktion der Infarktgröße durch BAY 58-2667 ($p^* < 0.001$ vs. Kontrolle) auf. Dargestellt sind die Infarktgrößen als Prozent vom Risikoareal der einzelnen Herzen (Mittelwert \pm SEM).

Eine Aktivierung von PKG durch sGC bewirkt die Öffnung des mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanals (mK_{ATP}), was wiederum in dem postulierten Signalweg der Postkonditionierung zum Schutz des Herzen nach Ischämie führt. In dieser Studie sollte deshalb die Beteiligung des mK_{ATP} an den durch BAY 58-2667 vermittelten Myokardschutz getestet werden.

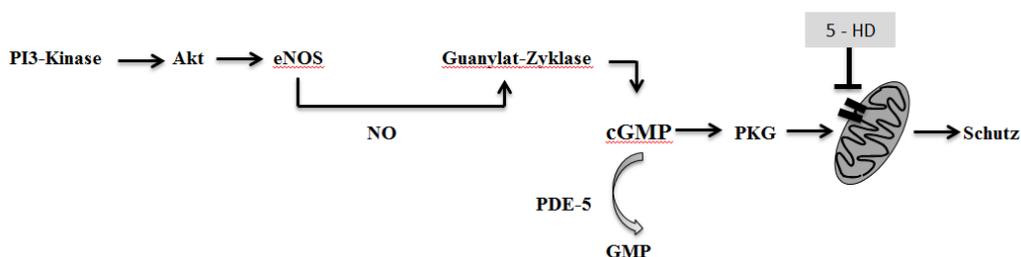


Abb. 3.6: Eingriffspunkt des Inhibitors des mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanals (mK_{ATP}) 5-HD in den postulierten Signalweg.

Hierfür wurde der Inhibitor 5-Hydroxydekanolat (5-HD) zusammen mit BAY 58-2667 während der Reperfusion verabreicht. Auch dieser Inhibitor konnte die durch BAY 58-2667 vermittelte Reduktion der Infarktgröße blockieren ($36,3 \% \pm 2,3 \%$, n.s. vs. korrespondierende Kontrolle). 5-HD alleine hatte keinen Einfluss auf die Infarktgröße (61). In Abb. 3.7 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt und in Tab.7.2 im Anhang zusammengefasst.

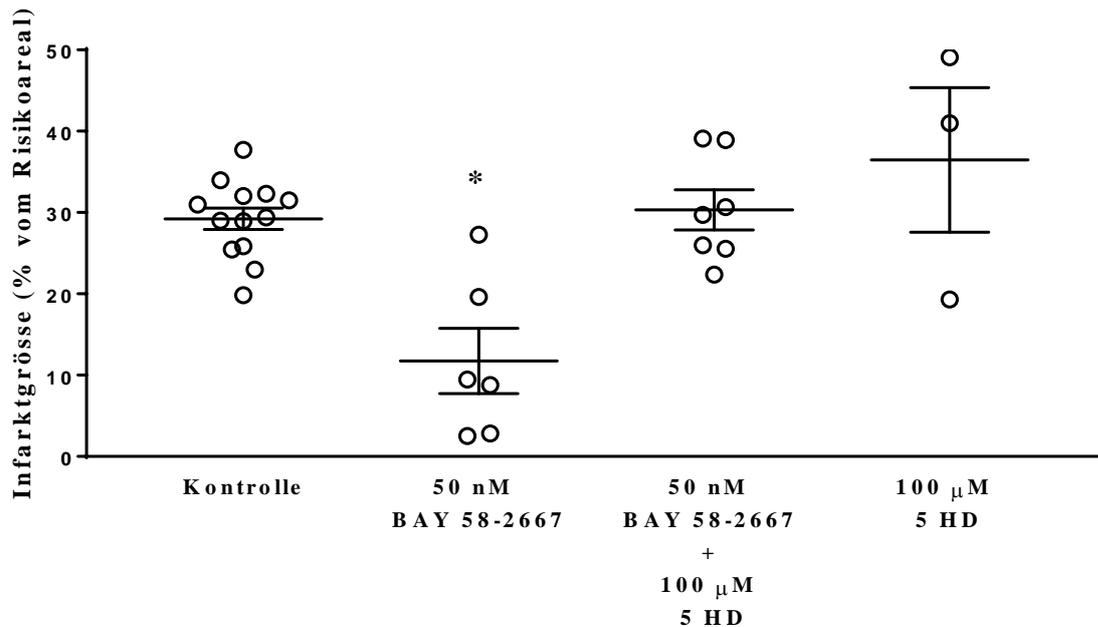


Abb. 3.7: Effekt der Inhibition des mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanals (mK_{ATP}) auf die kardioprotektive Wirkung von BAY 58-2667. Die Zugabe von 5-HD, einem selektiven Blocker des mK_{ATP} , hebt die signifikante Reduktion der Infarktgröße durch BAY 58-2667 ($p^* < 0.001$ vs. Kontrolle) auf. Dargestellt sind die Infarktgrößen als Prozent vom Risikoareal der einzelnen Herzen (Mittelwert \pm SEM).

Das kardioprotektive Potential von BAY 58-2667, einem Aktivator der sGC, konnte im Ischämie/Reperusionsmodell in isolierten Rattenherzen dargestellt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eNOS nicht an dem schützenden Signalweg beteiligt ist, was auf einen NO-unabhängigen Mechanismus hindeutet. Durch Inhibition von PKG und der Öffnung des mK_{ATP} wurde der BAY 58-2667 vermittelte Myokardschutz aufgehoben, was darauf hindeutet, dass sich der schützende Effekt von BAY 58-2667 sowohl oberhalb der Protein Kinase G (PKG) als auch oberhalb der Öffnung des mK_{ATP} entfaltet.

3.1.3 Hämodynamik *ex-vivo* perfundierter Rattenherzen

Bei der Klärung des Wirkmechanismus von BAY 58-2667, stellte die Infarktgröße den bestimmenden Parameter dar. Jedoch wurde dieser in diesem Teilprojekt dadurch ergänzt, dass

zur Charakterisierung der Vitalität der *ex-vivo* perfundierten Rattenherzen, kontinuierlich der Fluss gemessen wurde. Die jeweiligen Mittelwerte des Koronarflusses der einzelnen Gruppen sind in Tab.7.3 im Anhang zusammengefasst.

Unter Kontrollbedingungen wurde ein Abfall des Koronarflusses während der Ischämie auf 65 % des Koronarflusses der Einschlagphase verzeichnet. Zu Beginn der Reperfusion stieg die Flussrate wieder auf den Ausgangswert während der Einschlagphase an. Zwischen der Kontrollgruppe und BAY 58-2667 zeigte sich ein Unterschied in der Ischämiephase, wo die BAY 58-2667 Gruppe eine erhöhte Flussrate im Vergleich zur Kontrollgruppe (75 % von der Flussrate der Einschlagphase im Vergleich zu 65 % in Kontrollherzen) aufwies. Abb. 3.8 stellt die Ergebnisse der Flussrate graphisch dar.

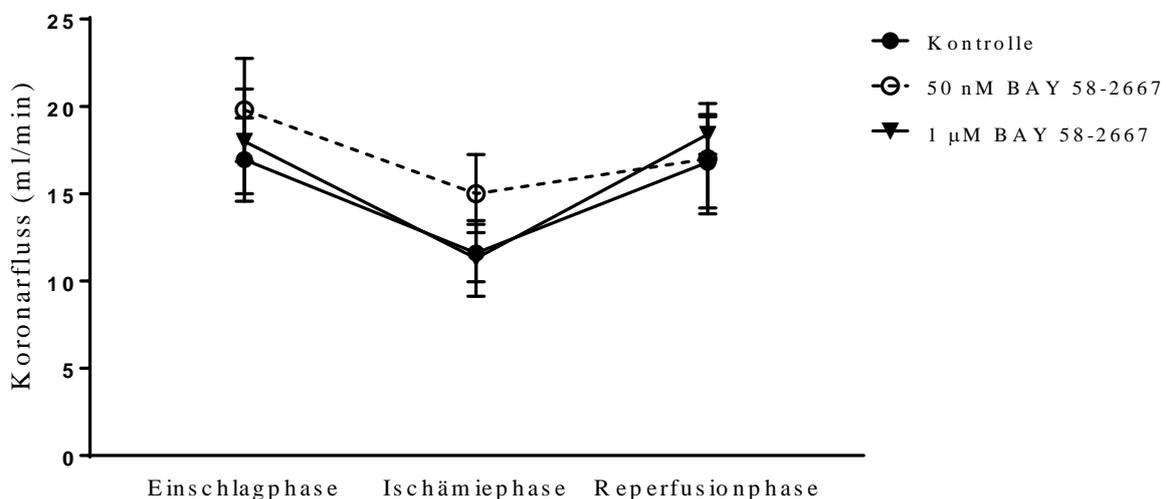


Abb. 3.8: Effekt von BAY 58-2668 auf den Koronarfluss in isolierten Rattenherzen. BAY 58-2667 wurde 5 min vor Beginn der Ischämiephase verabreicht. Es erhöht den Koronarfluss während der Ischämie von 65 % bezogen auf den Koronarfluss während der Einschlagphase in der Kontrolle - auf 75 % in BAY 58-2667 behandelten Rattenherzen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

Der Koronarfluss der BAY 58-2667 + L-NAME Gruppe wies ebenfalls einen Unterschied in der Ischämiephase auf. Auch hier zeigte sich eine Erhöhung des Koronarflusses im Vergleich zur Kontrollgruppe (72 % bezogen auf Ausgangswert der Einschlagphase in BAY 58-2667 + L-NAME vs. 65 % in korrespondierender Kontrolle). Zu Beginn der Reperfusion konnte jedoch kein Unterschied im Koronarfluss festgestellt werden. L-NAME allein hatte keinen Einfluss auf den Koronarfluss während der Ischämiephase im Vergleich zur Kontrolle, jedoch steigt der Koronarfluss während der Reperfusionphase nicht mehr auf den Ausgangswert in der Einschlagphase an. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.9 graphisch dargestellt.

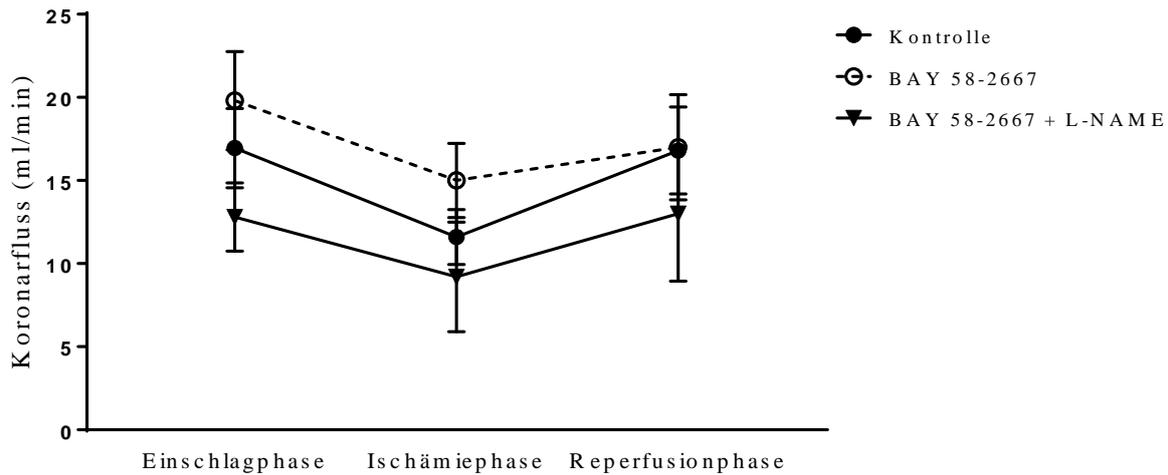


Abb. 3.9: Effekt von BAY 58-2668+L-NAME auf den Koronarfluss in isolierten Rattenherzen. BAY 58-2667 wurde zusammen mit dem eNOS Inhibitor L-NAME verabreicht. Es erhöht den Koronarfluss während der Ischämiephase von 65 % - bezogen auf den Koronarfluss während der Einschlagphase in der Kontrolle - auf 72 % in BAY 58-2667+L-NAME behandelten Rattenherzen. Der Inhibitor allein hat keinen Einfluss auf die Flussrate während der Ischämiephase. Es wurde kein Anstieg auf den Wert der Einschlagphase während der Reperusionsphase verzeichnet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

Das Flussverhalten der mit BAY 58-2667 und dem PKG Inhibitor KT-5823 behandelten Rattenherzen, zeigten keine Unterschiede in allen drei Phasen auf. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.10 graphisch dargestellt und in Tab. 7.3 im Anhang zusammengefasst.

Auch das Flussverhalten der mit BAY 58-2667 und 5-HD, welcher die Öffnung des mK_{ATP} blockiert, zeigte keine Unterschiede zur Kontrollgruppe in allen drei Phasen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.11 graphisch dargestellt und in Tab. 7.3 im Anhang zusammengefasst.

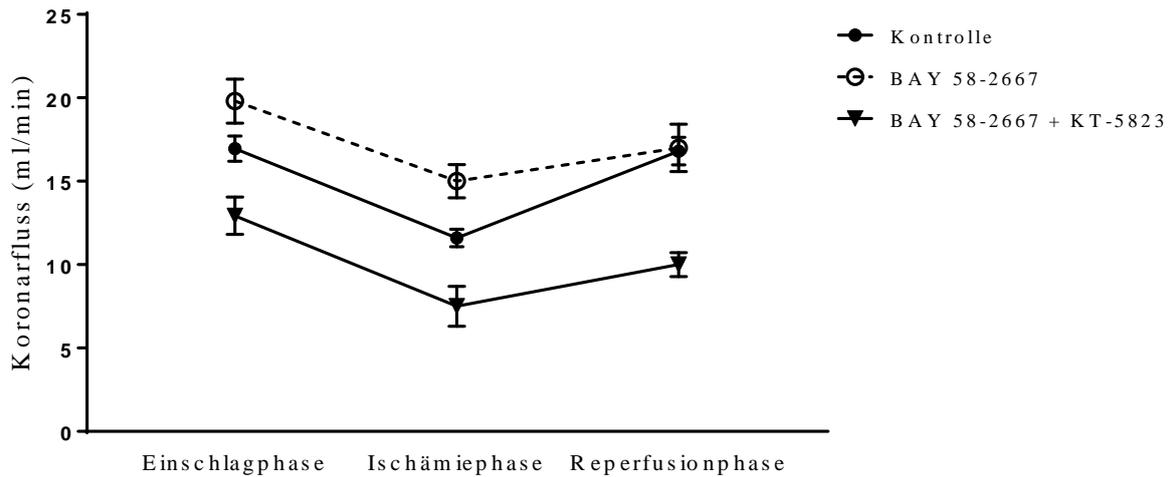


Abb. 3.10: Effekt von BAY 58-2668+KT-5823 auf den Koronarfluss in isolierten Rattenherzen. BAY 58-2667 wurde zusammen mit PKG Inhibitor KT-5823 verabreicht und es wurde kein Einfluss auf den Koronarfluss festgestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

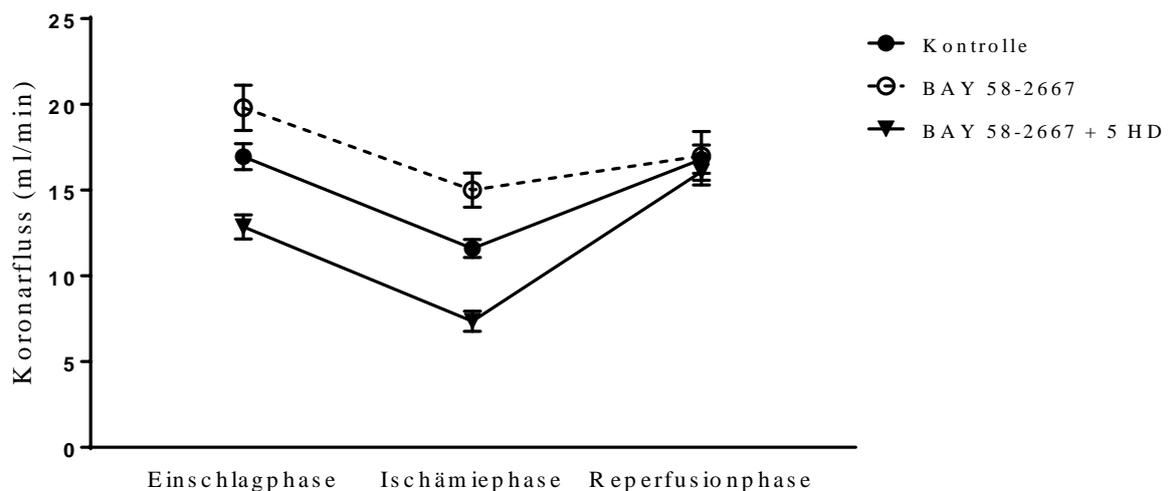


Abb. 3.11: Effekt von BAY 58-2668+5-HD auf den Koronarfluss in isolierten Rattenherzen. BAY 58-2667 wurde zusammen mit Inhibitor 5-HD, der die Öffnung des mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanals(mK_{ATP}) verhindert, verabreicht und es wurde kein Einfluss auf den Koronarfluss festgestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

Die Ergebnisse des Koronarflusses der behandelten isolierten Rattenherzen zeigten, dass der bestmögliche Fluss in den Gruppen BAY 58-2667 50nM und BAY 58-2667 + L-NAME erreicht worden ist, was auf eine gefässweitende Wirkung von BAY 58-2667 hindeutet, die möglicherweise durch zyklische Nukleotide vermittelt wurde.

3.1.4 Messung zyklischer Nukleotide mittels Radioimmunoassay

Es konnte bisher in dieser Arbeit gezeigt werden, dass BAY 58-2667 ein NO-unabhängiger sGC Aktivator ist. In dieser Studie wurde ebenfalls getestet, ob BAY 58-2667 den Myokardschutz über einen Anstieg des cGMP Gehaltes vermittelt. Hierfür wurden *ex-vivo* perfundierte Rattenherzen einer 30 min globalen Ischämie mit folgender 10 min Reperfusion unterzogen und anschließend ventrikuläre Biopsien zur Bestimmung der zyklischen Nukleotide Adenosinmonophosphat (cAMP) und Guanosinmonophosphat (cGMP) entnommen.

Der cAMP Gehalt zeigte keine Unterschiede zwischen den Kontrollherzen und Herzen, die während der Reperfusion mit BAY 58-2667 behandelt wurden ($0,11 \pm 0,018$ pmol/mg vs. $0,11 \pm 0,014$ pmol/mg). Allerdings bewirkte BAY 58-2667, zugeführt in der Reperfusion, einen signifikanten Anstieg des cGMP-Gehaltes ($4,12 \pm 0,81$ pmol/mg) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($0,14 \pm 0,058$ pmol/mg, $p = 0,0014$). Die Ergebnisse sind in Abb. 3.12 graphisch dargestellt.

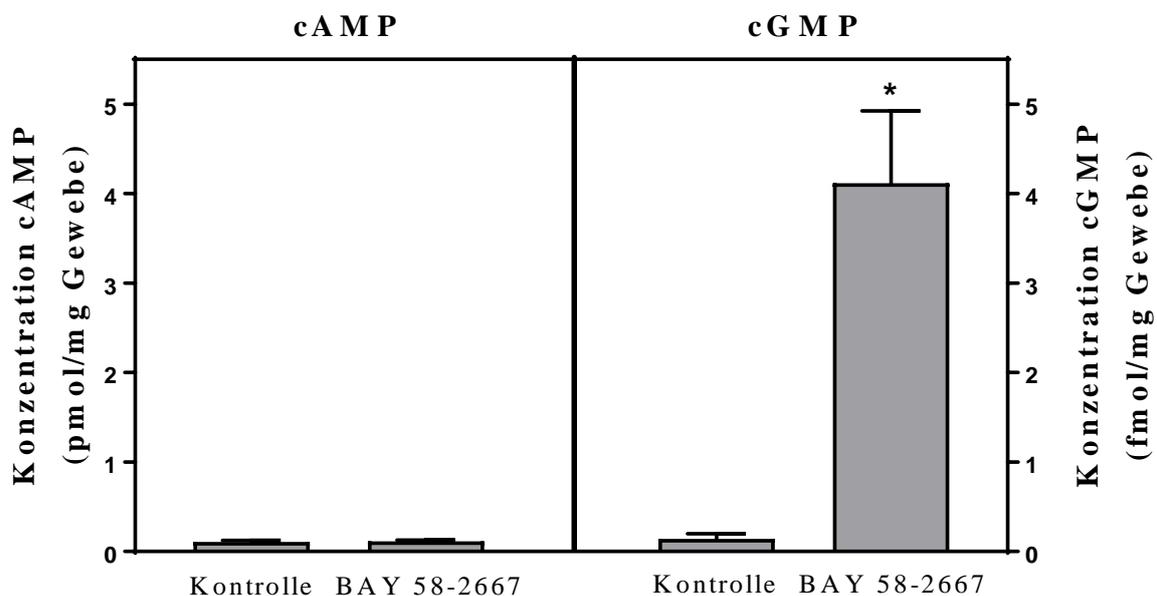


Abb. 3.12: Effekt von BAY 58-2667 auf den cAMP und cGMP Spiegel in isolierten Rattenherzen. Biopsien des linken Ventrikels von *ex-vivo* perfundierten Rattenherzen, die 30 min eine globale Ischämie und 10 min Reperfusion durchliefen, wurden auf den cAMP und cGMP Gehalt untersucht. Die Zugabe von BAY 58-2667 während der Reperusionsphase zeigte keinen Einfluss auf den cAMP Gehalt, aber bewirkte einen signifikanten Anstieg im cGMP Gehalt im Vergleich zur Kontrollgruppe (* $p=0.0014$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

Hiermit konnte bestätigt werden, dass der BAY 58-2667 vermittelte Myokardschutz über einen Anstieg von cGMP vermittelt wird.

3.2 Etablierung einer spezifischen ABCC 4 und 5-Knockdown-Methode

Um die Beteiligung der membranständigen Transporter ABCC 4 und 5 an der Regulierung der intrazellulären cAMP und cGMP Konzentration analysieren zu können, sollte in der vorliegenden Arbeit eine siRNA-vermittelte Ausschaltung der Expression von ABCC 4/5 erzielt werden.

3.2.1 Expression der ABCC 4 und 5 Transporter in Zellen und Gewebe

Zur Untersuchung der Expression und Lokalisation der Transportproteine ABCC 4/5 in Zellen und Gewebe, wurden Herzgewebeproben von Ratten, sowie eine humane Zelllinie, eine Mauszelllinie und diverse Rattenzelllinien mittels Western Blot und Immunofluoreszenz untersucht.

3.2.1.1 Bestimmung der ABCC 4-Expression mittels Western Blot Analyse

Zur Untersuchung der Proteinexpression von ABCC 4 wurde sowohl die Zytosol- als auch die Membranfraktion der Proteine verwendet. Diese Proben wurden aus einer Leberzelllinie (H4IIE) der Ratte, einer humanen Nierenzelllinie (HEK293), aus vaskulären weichen Muskelzellen (A7r5) der Ratte sowie der immortalen Mauszelllinie (HL-1) gewonnen. In Abb. 3.13 und Abb. 3.14 sind repräsentative Western Blots der Membranfraktion und Zytosolfraction dargestellt. Die Detektion des ABCC 4 Transporters in der Membranfraktion der H4IIE Zellen und den HEK Zellen zeigte eine erhöhte Expression vergleichbar zu dem ABCC 4 Standard. A7r5 Zellen und Rattenherzgewebe wiesen eine niedrigere Expression im Vergleich zum Standard auf, jedoch ist ABCC 4 klar nachweisbar. HL-1 Zellen zeigten den geringsten Gehalt an ABCC 4. Die Detektion von ABCC 4 in der Zytosolfraction zeigte ein ähnliches Bild wie in der Membranfraktion, jedoch mit wesentlich geringerer Intensität. H4IIE, HEK und die CHO Zellen (V33) zeigten die höchste Expression auf. In der zytosolischen Fraktion von A7r5 Zellen war ebenfalls ABCC 4 in geringer Konzentration nachweisbar, jedoch nicht in HL-1 Zellen und im Gewebe von Rattenherzen.

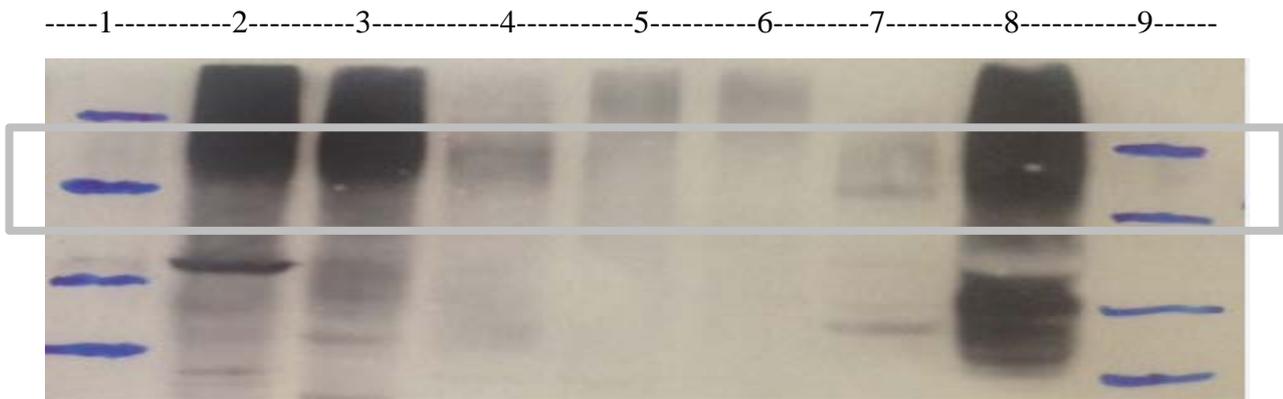


Abb. 3.13: Repräsentativer Western Blot der ABCC 4-Expression in der Membranfraktion. Die Proteine (60 µg) wurden auf einem 10%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Spur 1/9 Marker; Spur 2 H4IIE Zellen; Spur 3 HEK Zellen; Spur 4 A7r5; Spur 5/6 HL-1; Spur 7 Rattenherz; Spur 8 ABCC 4 Standard SNG.

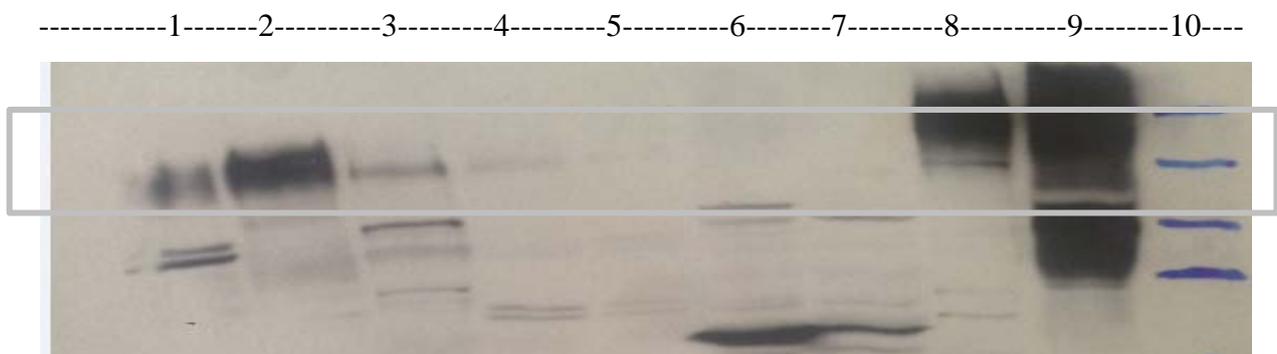


Abb. 3.14: Repräsentativer Western Blot der ABCC 4-Expression in der Zytosolfraction. Die Proteine (60 µg) wurden auf einem 10%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Spur 1 H4IIE Zellen; Spur 2 HEK Zellen; Spur 3 A7r5; Spur 4/5 HL-1; Spur 6/7 Rattenherz; Spur 8 V33-CHO Zellen; Spur 9 ABCC 4 Standard SNG; Spur 10 Marker.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Rattenherzen und die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien ABCC 4 Transporter in der Membranfraktion aufweisen.

3.2.1.2 Bestimmung der ABCC 5-Expression mittels Immunfluoreszenz

Da die Darstellung der ABCC 5 Expression mittels Western-Blot kaum Aussagekraft hatte (siehe Abb. 7.1 im Anhang), wurden immunohistochemische Färbungen zur Untersuchung der Lokalisation und Expression durchgeführt. In Abb. 3.15 wurden HL-1 Zellen mit einem ABCC 5 Antikörper angefärbt. HL-1 Zellen zeigten eine diffuse ABCC 5 Expression. Im Vergleich zu HL-1 Zellen zeigten A7r5 Zellen die membranständige Lokalisation von ABCC 5 Transportern auf (Abb. 3.16), während in isolierten Rattenkardiomyozyten (ARK) der ABCC 5 Transporter sowohl an der Membran, als auch im Zytosol nachweisbar war (Abb. 3.17).

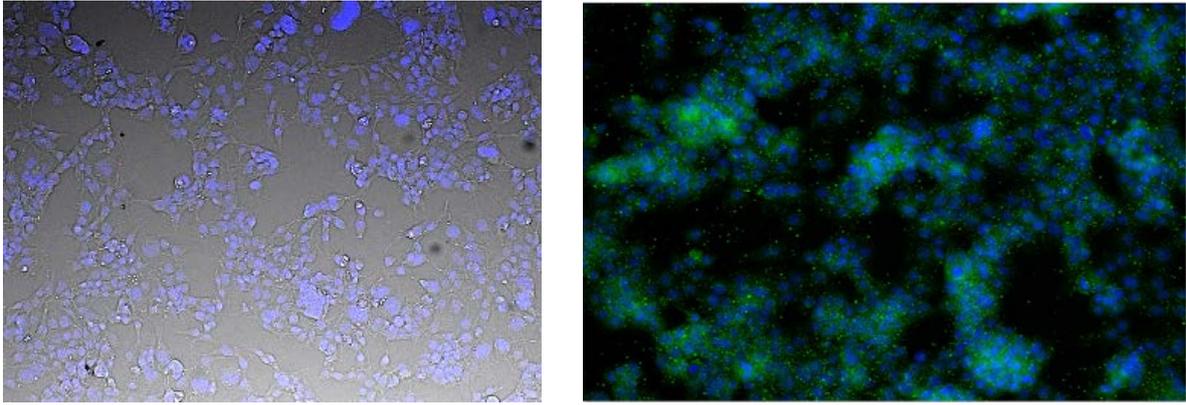


Abb. 3.15: Mikroskopische Aufnahmen zum Nachweis der ABCC 5-Lokalisation in HL-1 Zellen.

Links: mit DAPI (Kernfärbung) (HL-1: DAPI 1:10.000 für 1 min)

Rechts: mit DAPI (Kernfärbung) + Membranfärbung ABCC 5 (Blockade mit Goat Serum 5 % für 120 min; 1. Antikörper ABCC 5 (AMF) 1:100 über Nacht; 2. Antikörper Alexa Fluor 1:200 für 60 min.; DAPI 1:10.000 für 1 min)

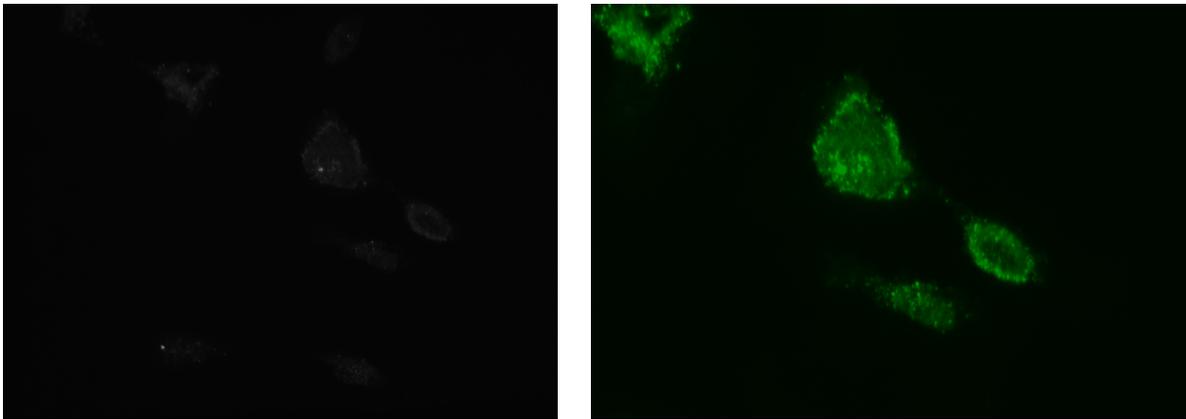


Abb. 3.16: Mikroskopische Aufnahmen zum Nachweis der ABCC 5-Lokalisation in A7r5 Zellen.

Links: Blockade mit Goat Serum 10 % für 120 min;

Rechts: Blockade mit Goat Serum 10 % für 120 min; 1. Antikörper ABCC 5 (AMF) 1:100 über Nacht; 2. Antikörper Alexa Fluor 1:200 für 60 min.

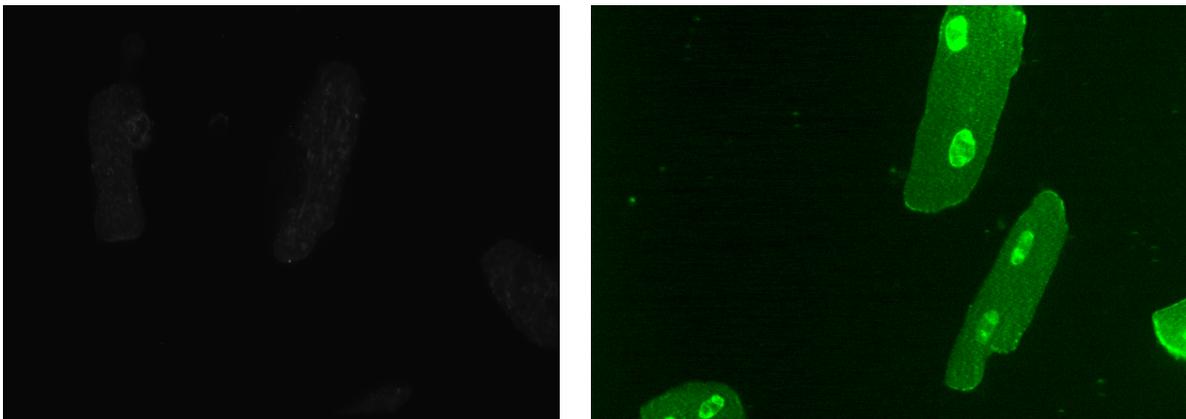


Abb. 3.17: Mikroskopische Aufnahmen zum Nachweis der ABCC 5-Lokalisation in isolierten adulten Rattenkardiomyozyten (ARK).

Links: Blockade mit Goat Serum 50 % für 120 min;

Rechts: Blockade mit Goat Serum 50 % für 120 min; 1. Antikörper ABCC 5 (AMF) 1:100 über Nacht; 2. Antikörper Alexa Fluor 1:200 für 60 min

3.2.1.3 Lipofektion mittels FuGENE®6 Reagent

Zunächst wurde im Rahmen dieser Arbeit die Möglichkeit der Transfektion von Zellen mittels Lipofektion untersucht und die Transfektionsrate mittels Real Time-RT-PCR analysiert.

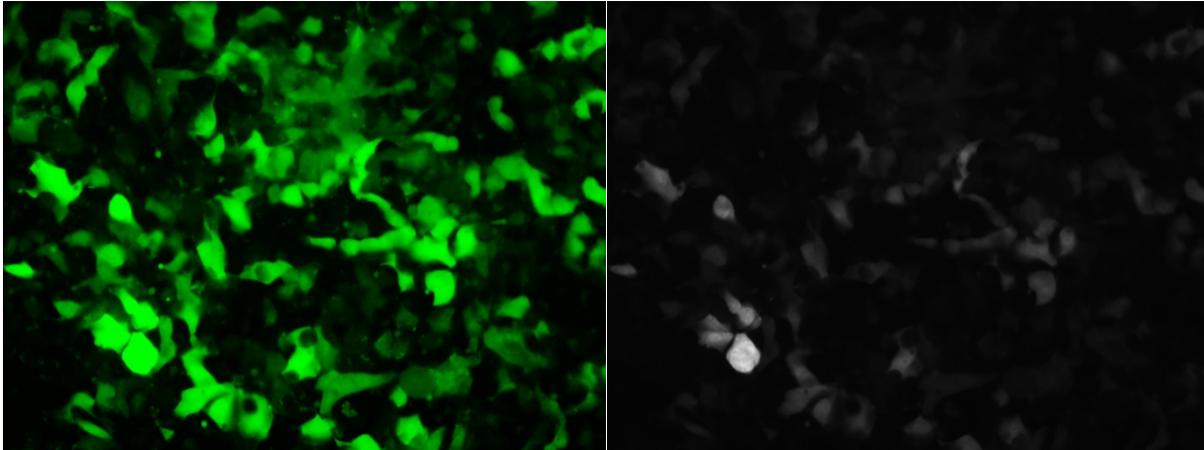


Abb. 3.18: Mikrosk. Aufnahmen von HL-1 Zellen zum Nachweis der Transfektion mittels FuGENE.

Links: HL-1 Zellen zeigen eine erfolgreiche Transfektion mittels FuGENE durch Grünfärbung an.

Rechts: HL-1 Zellen ohne Fluoreszenzanregendes Licht

Bei der Anwendung des FuGENE-Transfektionsreagenz wurden die Zellen zunächst mit 2 μ l (100 nM) ABCC 4/5 DNA und 6,0/3,0 μ l/ml (Verhältnis 3:1/3:2) FuGENE transfiziert. In Abb. 3.18 sind repräsentative Aufnahmen von HL-1 Zellen nach der Lipofektion dargestellt.

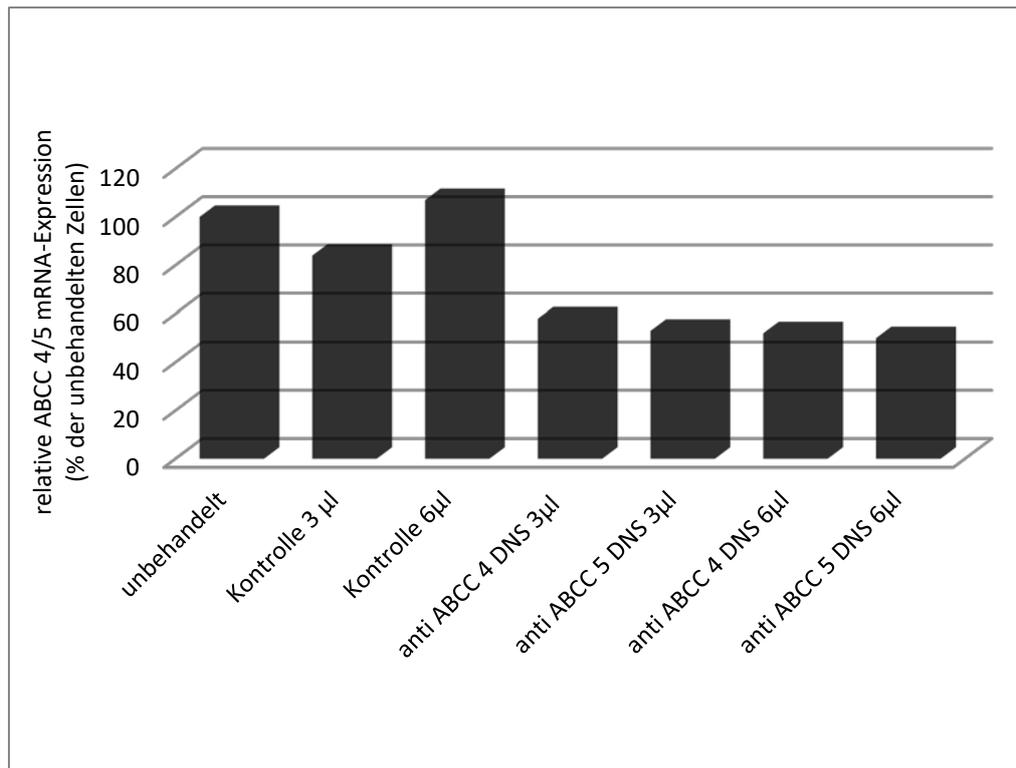


Abb. 3.19: Quantifizierung der ABCC 4/5-mRNA mittels Real Time-RT-PCR (TaqMan®). HL-1 Zellen wurden mit 100 nM DNA transfiziert, die RNA 48 h nach Transfektion präpariert. Das Diagramm zeigt die ABCC 4/5-mRNA-Expression, dargestellt als Prozentsatz der ABCC 4/5-Expression unbehandelter Zellen nach Normalisierung auf 18S-rRNA.

Die Transfektionsrate war hoch und sollte mittels Analyse des mRNA-Gehaltes durch Real Time-RT-PCR weitergehend untersucht werden. Die relative ABCC 4 und 5 mRNA Expression ist in Abb. 3.19 graphisch dargestellt. Unbehandelte Zellen und die Kontroll-Lipofektion von ABCC 4 und 5 zeigten keinen Unterschied. Jedoch ließ sich in behandelten Zellen eine Suppression des mRNA Gehaltes auf 52 % bzw./ 50 % (ABCC 4 und 5) erzielen.

Unterschiedliche FuGene-Konzentrationen veränderten nicht die Effektivität der Suppression. Die Kontroll-DNA war im Vergleich zu den unbehandelten Zellen praktisch ohne Effekt.

Das Fluoreszenzsignal in den HL-1 Zellen verringerte sich während des Passagierens, respektive die Transfektionseffizienz.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass ein *knock down* mittels Lipofektion möglich ist, jedoch nicht stabil.

3.2.1.4 siRNA-Technologie

Da die Transfektion mittels FuGENE nicht stabil war, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Möglichkeit einer siRNA vermittelten Ausschaltung der ABCC 4/5 Transporter untersucht.

Hierzu wurden nach bestimmten Kriterien spezifisch gegen ABCC 4 und 5 gerichtete siRNAs ausgewählt (siehe Abschnitt 2.1.9.2), mit deren Hilfe ein ABCC 4 und 5-*knockdown* in der Rattenzelllinie A7r5 durchgeführt werden sollte.

3.2.1.4.1 Klonierung der siRNA in die Vektoren V4 und V5

Zunächst wurden die vier ausgewählten siRNAs in die Vektoren V4 und V5 ligiert, in *E.coli* transformiert und vermehrt. Nach einer PCR der isolierten Plasmid-DNA wurden diese in einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel aufgetrennt, um die Bakterienklone auswählen zu können, die den Vektor samt siRNA-Insert aufwiesen. Eine solche PCR-Analyse ist in Abb. 3.20 dargestellt. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe, mit 450 bp für den leeren Kontrollvektor V5 und 520 bp für den Vektor V5 mit Insert, konnten die Bakterienklone differenziert werden.

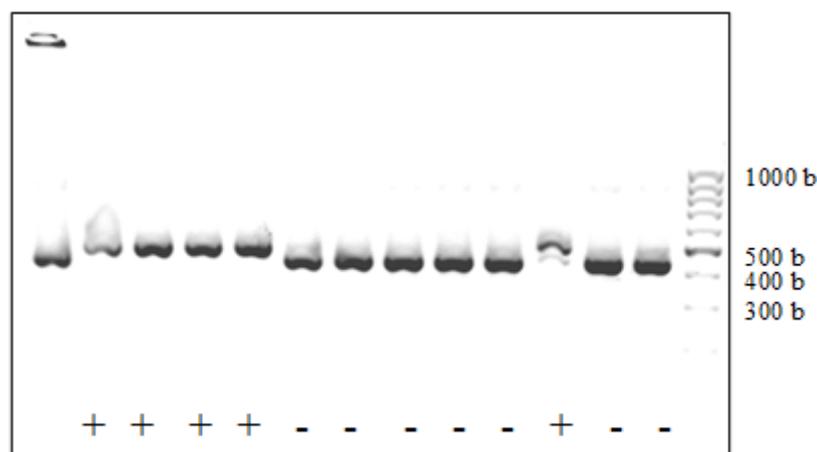


Abb. 3.20: Darstellung einer gelelektrophoretischen Auftrennung der Ligationsprodukte zur Auswahl der geeigneten Bakterienklone. Durchgeführt wurde die Auftrennung in einem 2%-igen Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel. Der dargestellte leere Kontrollvektor V5 (Spur 1) hat eine Größe von 450 bp, während die Vektoren mit den Inserts (Spur 2 -12) 520 bp groß sind. Mit (+) dargestellt: Bakterienklone mit Insert

Zusätzlich wurden die genauen Basensequenzen der ligierten siRNAs durch Sequenzierung ermittelt. Auf dessen Grundlage wurden für ABCC 4 die Klone V5 si1-19 (verwendeter Vektor 5 mit ligierter siRNA 1, 19.Klon), V5 si2-15 (verwendeter Vektor 5 mit ligierter siRNA2, 15.Klon) und V5 si3-11 (verwendeter Vektor 5 mit ligierter siRNA3, 11.Klon) ausgewählt.

Für ABCC 5 wurden die Klone V5 si1-2 (verwendeter Vektor 5 mit ligierter siRNA 1, 2.Klon), V5 si2-6 (verwendeter Vektor 5 mit ligierter siRNA2, 6.Klon) und V5 si3-10 (verwendeter Vektor 5 mit ligierter siRNA3, 10.Klon) verwendet. Deren DNA wurde dann vermehrt, isoliert und zur Virusproduktion eingesetzt.

3.2.1.4.2 Virale Transfektion und Infektion der Zielzellen A7r5

Nach erfolgreicher Virusproduktion in der Verpackungszelllinie GP2-293 wurden die A7r5 Zellen für ABCC 4 mit den isolierten, den Vektor V5 bzw. den Vektor V5 si1-19, V5 si2-15 und V5 si3-11 enthaltenden Viren infiziert. Die Infektion für ABCC 5 erfolgte mit den isolierten, den Vektor V5 bzw. den Vektor V5 si1-2, V5 si2-6 und V5 si3-10 enthaltenden Viren. Die A7r5 Zellen, die den Vektor in ihr Genom integriert hatten, konnten mittels Hygromycin selektiert werden und produzierten das grün fluoreszierende Protein pEGFP-C1 (EGFP = enhanced green fluorescent protein).

Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die auf Deckgläschen ausgesäten, infizierten A7r5 Zellen auf die Expression von pEGFP-C1 untersucht. Wie in der Abb. 3.21 erkennbar, lag die Quote der erfolgreich infizierten Zellen bei ca. 80 %.

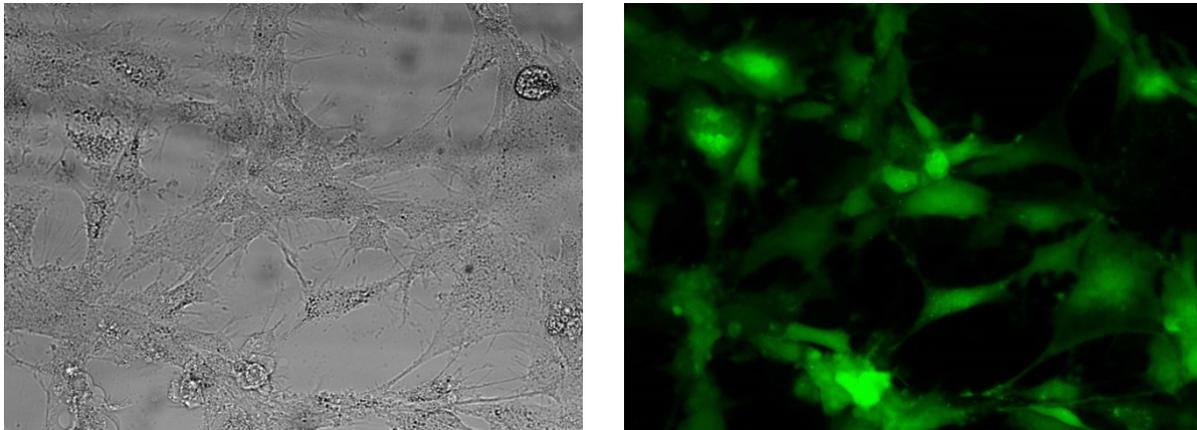


Abb. 3.21: Darstellung der auf Deckgläschen gewachsenen, mit V5 enthaltenden Viren infizierten A7r5 Zellen.

Links: A7r5 Zellen wurden unter einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung und einer Anregung von 488 nm betrachtet.

Rechts: Eine grüne Fluoreszenz zeigt die Integration des Vektors V5 ins Genom der A7r5 Zellen an und infolgedessen die Expression des pEGFP-C1.

3.2.1.4.3 Expression von ABCC 4 und 5 in den transfizierten A7r5 Zellen

Um zu überprüfen, wie effektiv die viral transfizierte siRNA die Expression von ABCC 4 und 5 hemmt, wurden von verschiedenen Passagen der transfizierten A7r5 Zellen Lysate gewonnen

und mittels quantitativer RT-PCR nach dem TaqMan®-Prinzip die ABCC 4 und 5-mRNA bestimmt.

In Abb. 3.22 war ein deutlicher Abfall der ABCC 4-mRNA auf 4 % und 12 % in den Lysaten der V5 si1-19 transfizierten A7r5 Zellen in der 2. und 4. Passage im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen (V5 Ko) zu erkennen. Die Transfektion mit den V5 si2-15 reduzierte die Expression auf 15 % (Passage 2) und 39 % (Passage 4). Bei V5 si3-11 reduzierte sich die ABCC 4 Expression auf 42 % (Passage 2) und 65 % (Passage 4).

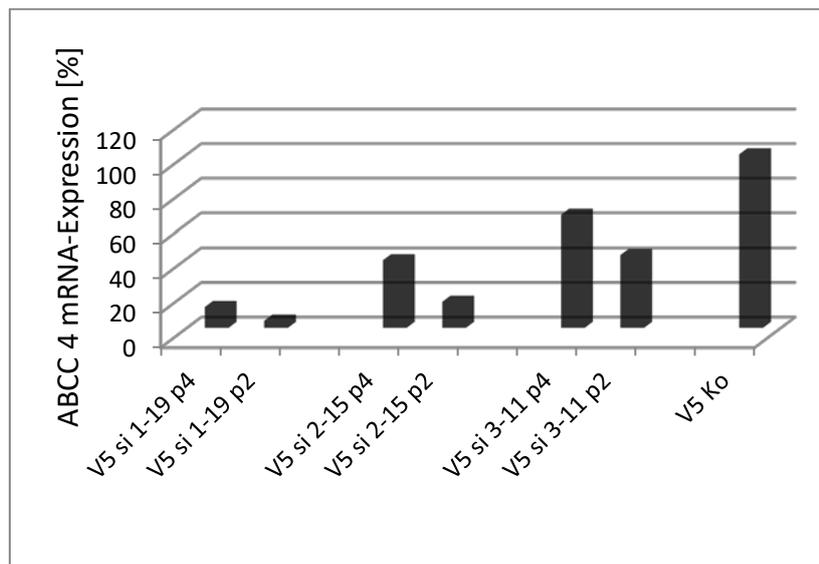


Abb. 3.22: Darstellung der ABCC 4-mRNA-Expression in den transfizierten A7r5 Zellen ermittelt durch quantitative RT-PCR nach dem TaqMan®-Prinzip. Die Werte der kontrolltransfizierten Zellen (V5 Ko) entsprechen 100 %. Dargestellt sind die Mittelwerte eines repräsentativen Experiments in Dreifachbestimmung. Es erfolgte eine Normalisierung auf 18S rRNA. (p=Passage)

In Abb. 3.23 ist ein deutlicher Abfall der ABCC 5-mRNA auf 13 % (Passage 2) und 25 % (Passage 4) in den Lysaten der V5 si3-10 transfizierten A7r5 Zellen im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen (V5 Ko) zu erkennen. Die Transfektion mit den V5 si2-6 reduzierte die Expression auf 12 % (Passage 2) und 56 % (Passage 4). Bei V5 si1-2 reduzierte sich die ABCC 5 Expression auf 47 % (Passage 2) und 65 % (Passage 4).

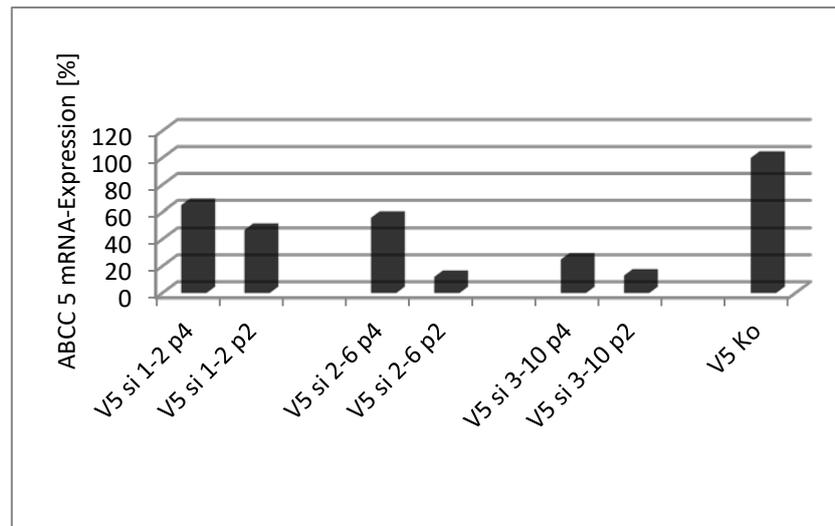


Abb. 3.23: Darstellung der ABCC 5-mRNA-Expression in den transfizierten A7r5 Zellen ermittelt durch quantitative RT-PCR nach dem TaqMan®-Prinzip. Die Werte der kontrolltransfizierten Zellen (V5 Ko) entsprachen 100 %. Dargestellt sind die Mittelwerte eines repräsentativen Experiments in Dreifachbestimmung. Es erfolgte eine Normalisierung auf 18S rRNA. (p=Passage)

Während der Passagierung der A7r5 Zellen, verbunden mit der notwendigen Fortführung der Selektion mittels Hygromycin, erwies sich diese Zelllinie als nicht robust genug. Bei jeder Passagierung dünnte die Zelldichte immer weiter aus, was zu einem Niedergang aller Zellen in den Kulturflaschen führte. Parallel mitgeführte Zellen, ohne virale Transfektion, belegten, dass es sich nicht um praktische Fehler handelte.

Aus diesem Grund wurde eine weitere Rattenzelllinie (H4IIE Zellen) genutzt, um die Methode der viralen Transfektion zu verifizieren.

3.2.1.4.4 Virale Transfektion und Infektion der Zielzellen H4IIE

H4IIE Zellen wurden nach dem gleichen Protokoll wie A7r5 Zellen mit den isolierten, den Vektor V5 bzw. den Vektor V5 si1-19, V5 si2-15 und V5 si3-11 enthaltenden Viren infiziert. Für ABCC 5 mit den isolierten, den Vektor V5 bzw. den Vektor V5 si1-2, V5 si2-6 und V5 si3-10. Die H4IIE Zellen, die den Vektor in ihr Genom integriert hatten, konnten mittels Hygromycin selektiert werden und produzierten das grün fluoreszierende Protein pEGFP-C1 (EGFP = *enhanced green fluorescent protein*).

Auch für diese Zelllinie wurden mittels Immunfluoreszenzmikroskopie die auf Deckgläschen ausgesäten, infizierten H4IIE Zellen auf die Expression von pEGFP-C1 untersucht. Wie in der Abb. 3.24 erkennbar, lag die Quote der erfolgreich infizierten Zellen bei ca. 90 %.

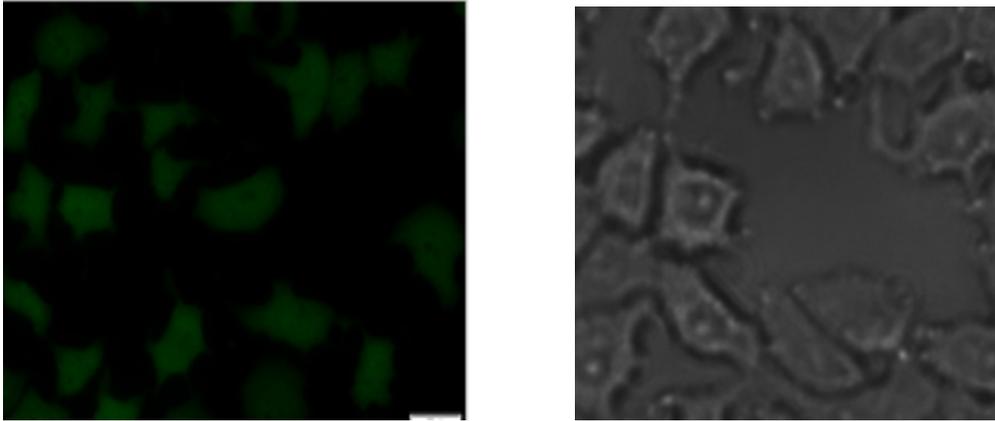


Abb. 3.24: Darstellung der auf Deckgläschen gewachsenen, mit V5 enthaltenen Viren infizierten H4IIE Zellen.

Rechts: H4IIE Zellen wurden unter einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung und einer Anregung bei 488 nm betrachtet.

Links: Eine grüne Fluoreszenz zeigt die Integration des Vektors V5 ins Genom der H4IIE Zellen und infolgedessen die Expression des pEGFP-C1.

3.2.1.4.5 Expression von ABCC 4 und 5 in den transfizierten H4IIE Zellen

Zur Überprüfung, wie effektiv die viral transfizierte siRNA die Expression von ABCC 4 und 5 in den H4IIE Zellen hemmt, wurden ebenfalls von verschiedenen Passagen der transfizierten Zellen Lysate gewonnen und mittels quantitativer RT-PCR nach dem TaqMan®-Prinzip die ABCC 4 und 5-mRNA bestimmt.

In Abb. 3.25 ist ein deutlicher Abfall der ABCC 4-mRNA auf 4 % und 2 % in den Lysaten der V5 si1-19 transfizierten H4IIE Zellen in der 2. und 4. Passage im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen (V5 Ko) zu erkennen. Die Transfektion mit den V5 si2-15 reduzierte die Expression auf 49 % (Passage 2) und 25 % (Passage 4). Bei V5 si3-11 reduzierte sich die ABCC 4 Expression auf 88 % (Passage 2) und 52 % (Passage 4).

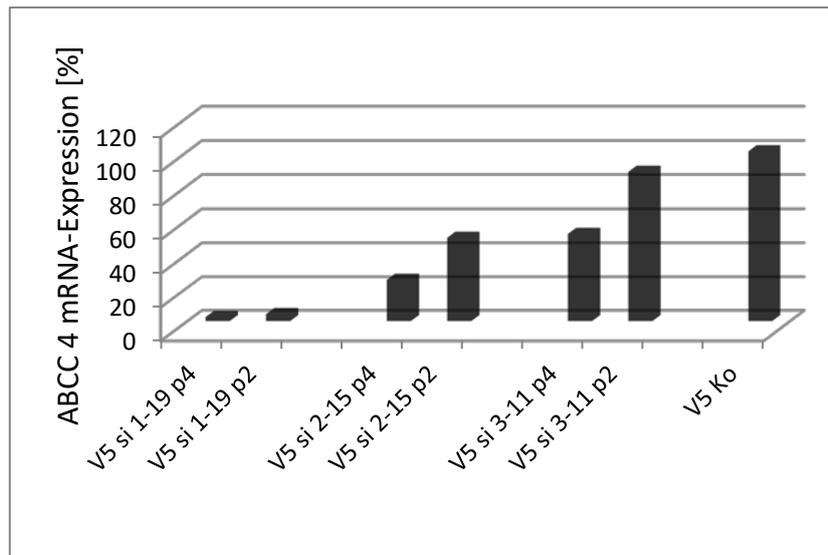


Abb. 3.25: Darstellung der ABCC 4-mRNA-Expression in den transfizierten H4IIE Zellen ermittelt durch quantitative RT-PCR nach dem TaqMan®-Prinzip. Die Werte der kontrolltransfizierten Zellen (V5 Ko) entsprechen 100 %. Dargestellt sind die Mittelwerte eines repräsentativen Experiments in Dreifachbestimmung. Es erfolgte eine Normalisierung auf 18S rRNA. (p=Passage)

In Abb. 3.26 ist ein deutlicher Abfall der ABCC 5-mRNA auf 23 % (Passage 2) und 17 % (Passage 4) in den Lysaten der V5 si3-10 transfizierten H4IIE Zellen im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen (V5 Ko) zu erkennen. Die Transfektion mit den V5 si2-6 reduzierte die Expression auf 60 % (Passage 2) und 30 % (Passage 4). Bei V5 si1-2 reduzierte sich die Expression auf 74 % (Passage 2) und 56 % (Passage 4).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der siRNA vermittelte *knock down* auf mRNA Ebene für beide erfolgreich war. Es ist auffällig, dass die Quantität der Expression sich von siRNA Sequenz zu siRNA Sequenz unterscheidet.

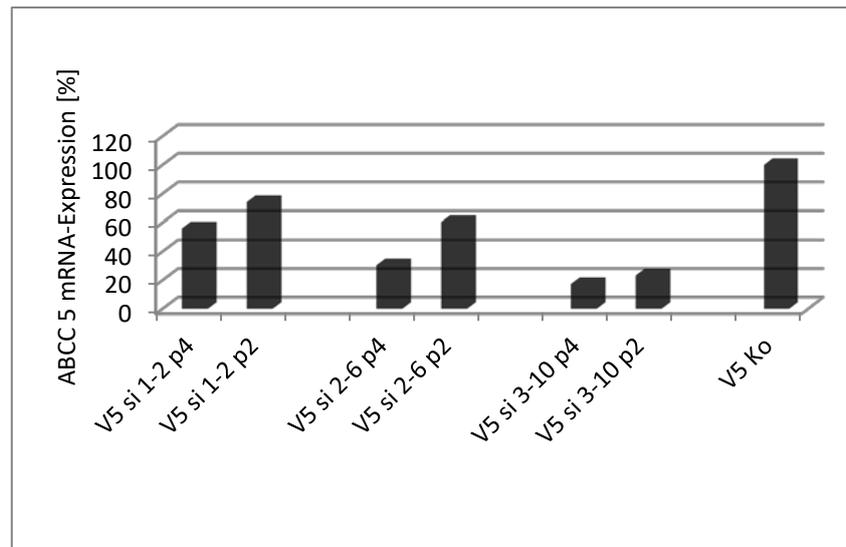


Abb. 3.26: Darstellung der ABCC 5-mRNA-Expression in den transfizierten H4IIE Zellen ermittelt durch quantitative RT-PCR nach dem TaqMan®-Prinzip. Die Werte der kontrolltransfizierten Zellen (V5 Ko) entsprechen 100 %. Dargestellt sind die Mittelwerte eines repräsentativen Experiments in Dreifachbestimmung. Es erfolgte eine Normalisierung auf 18S rRNA. (p=Passage)

3.2.1.4.6 Expressionsanalyse mittels Western Blot

Nachdem geeignete siRNA-Sequenzen, die mittels viraler Transfektion in der Zelllinie H4IIE eingebracht wurden, zur Reduktion der ABCC 4- und ABCC 5-mRNA-Expression führten, sollte die erreichte Suppression auch auf Proteinebene überprüft werden.

Es zeigte sich eine deutliche Verringerung des Proteins in den mit siRNA transfizierten Zellen gegenüber des Proteingehalts der mit dem Kontrollvektor behandelten Zellen, in Korrelation zu den Ergebnissen der mRNA-Expressionsergebnissen, wie in Abb. 3.27 an einem repräsentativen Western Blot dargestellt.

-----1-----2-----3-----4-----5-----6-----7-----8-----9-----10-----



Abb. 3.27: Repräsentativer Western Blot der ABCC 4 und 5- Proteinexpression in siRNA transfizierten H4IIE Zellen. Das zelluläre Gesamtprotein (60 µg) wurde auf einem 10%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Spur 1 V5 Ko; Spur 2 V5 si1-19-transfizierte Zellen; Spur 3 V5 si2-15-transfizierte Zellen; Spur 4 V5 si3-11 -transfizierte Zellen; Spur 5 V5 si1-2 -transfizierte Zellen; Spur 6 V5 si2-6-transfizierte Zellen; Spur 7 V5 si1-10 -transfizierte Zellen; Spur 8 Marker; Spur 9 -ABCC 4 Standard (SNG) Spur 10 -ABCC 5 Standard (AMF)

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass auch auf Proteinebene die Ausschaltung der ABCC 4/5 Expression nachgewiesen werden konnte.

3.2.1.4.7 Funktionelle Analysen nach viraler Transfektion

Die viral eingebrachten siRNA Sequenzen V5 si1-19 (ABCC 4) und V5 si3-10 (ABCC 5) erwiesen sich in Hinblick auf die Suppression ABCC 4 und 5 als besonders effizient. Somit sind diese Sequenzen ausgewählt worden, die Konsequenzen der Transportersuppressionen in Zellen zu untersuchen. Hierfür sollte das Ansprechen der Zelllinie H4IIE auf Zytostatika geprüft werden

3.2.1.4.7.1 Zytotoxizitätstest Alamar Blue

Da die Grundstruktur der Transportersubstrate (cAMP und cGMP) eine Purinstruktur enthalten, wurden dementsprechend Thioguanin und Mercaptopurin als Zytostatika eingesetzt und mit Hilfe des Zytotoxizitätstestes überprüft.

Zunächst wurden unbehandelte H4IIE Zellen getestet. Hierfür erfolgte 24 h nach Aussaat der Zellen in 96-Loch-Mikrotiterplatten die Zytostatikaapplikation in unterschiedlichen Konzentrationsstufen. Abb. 3.28 zeigt die Änderung der Zellviabilität nach Zugabe von Thioguanin und Mercaptopurin und nachfolgender Inkubation von 48 h und 72 h. Nach Zugabe von Thioguanin konnte eine deutliche Abnahme der Zellviabilität bei Konzentrationen ab 1 μM erzielt werden. Inkubationszeiten von 48 h bis 72 h waren hier optimal. Bei Applikation von Mercaptopurin konnte ab 10 μM eine Verringerung der Zellviabilität der Zellen gezeigt werden. Bei 31,6 μM Mercaptopurin sank die Zellviabilität bei 72 h Inkubation auf bis zu 75 %.

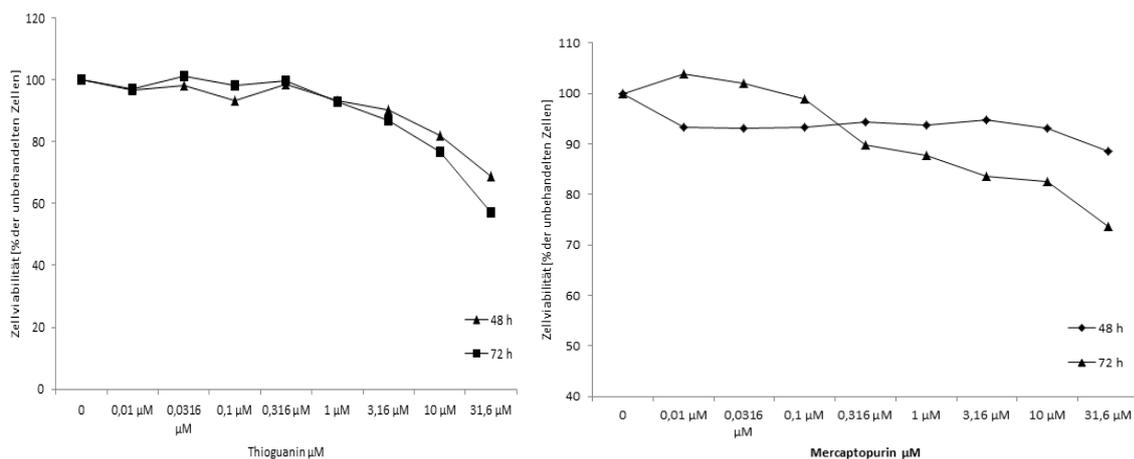


Abb. 3.28: Zytotoxische Wirkung von Thioguanin und Mercaptopurin auf unbehandelten H4IIE Zellen. H4IIE Zellen wurden 24 h nach Aussaat der Zellen (3.000 Zellen/Loch) mit den jeweiligen Konzentrationen an Zytostatikum behandelt und die Zellviabilität nach einer Inkubation von 48 h und 72 h mit dem Alamar Blue-Assay bestimmt.

Entsprechend erfolgte auch bei der transfizierten Zelllinie 24 h nach Aussaat der Zellen in 96-Loch-Mikrotiterplatten die Zytostatikaapplikation in unterschiedlichen Konzentrationsstufen.

Aus Abb. 3.29 geht die Änderung der Zellviabilität nach Zugabe von Thioguanin und nachfolgender Inkubation von 48 h und 72 h hervor. Sowohl nach 48 h als auch nach 72 h Thioguaninapplikation war kein Ansprechen der Zelllinie zu erkennen.

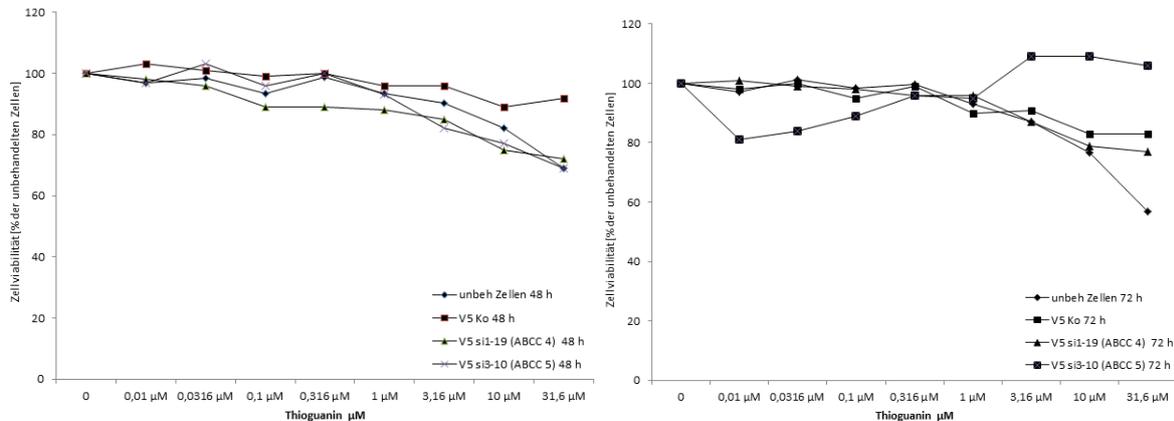


Abb. 3.29: Zytotoxische Wirkung von Thioguanin nach viraler Transfektion und *knock down* von ABCC 4 und ABCC 5. Transfizierte H4IIE Zellen wurden ausgesät (3.000 Zellen/Loch), 24 h nach der Aussaat mit Thioguanin behandelt, die Zellviabilität wurde nach einer Inkubation von 48 h und 72 h mit dem Alamar Blue-Assay bestimmt. Es sind die Mittelwerte von 2 unabhängigen Experimenten gezeigt.

Die zytotoxische Wirkung von Mercaptopurin ist in Abb. 3.30 graphisch dargestellt. Bei Applikation von Mercaptopurin konnte für die siRNA transfizierte Zellreihe (Klon 10/ABCC 5) bei Konzentrationen ab 0,01 µM und einer Inkubationszeit von 72 h eine Verringerung der Zellviabilität gezeigt werden.

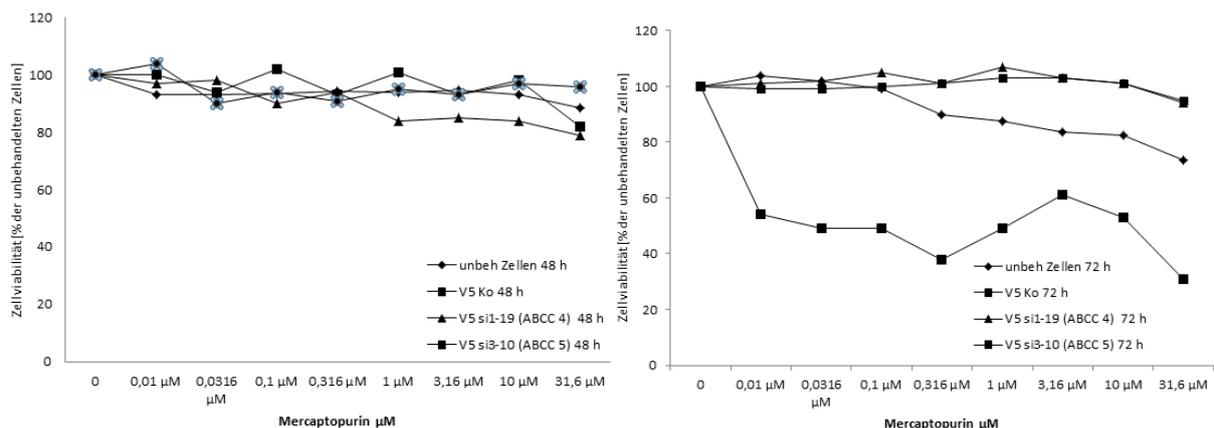


Abb. 3.30: Zytotoxische Wirkung von Mercaptopurin nach viraler Transfektion und *knockdown* von ABCC 4 und ABCC 5. Transfizierte H4IIE Zellen wurden ausgesät (3.000 Zellen/Loch), 24 h nach der Aussaat mit Mercaptopurin behandelt, die Zellviabilität wurde nach einer Inkubation von 48 h und 72 h mit dem Alamar Blue-Assay bestimmt. Es sind die Mittelwerte von 2 unabhängigen Experimenten gezeigt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass im Rahmen dieser Arbeit eine siRNA vermittelte Ausschaltung von ABCC 4/5 in H4IIE Zellen erreicht worden ist, wobei ABCC 5 auch Folgen des *knock down* im Zytotoxizitätstest gezeigt hat.

4 Diskussion

Die Diagnose der Koronaren Herzkrankheit ist mit Abstand die prognostisch ungünstigste, gefolgt vom akuten Myokardinfarkt und der Herzinsuffizienz. Die Sterblichkeit bei Frauen in der Summe aller kardiologischen Diagnosen ist deutlich höher als bei Männern. Ausnahmen bei den einzelnen Diagnosen stellen die Koronare Herzkrankheit und der akute Myokardinfarkt dar. Hier ist die Sterbeziffer der Männer im Vergleich deutlich erhöht. Die bereits 2013, 2014 und 2015 beobachteten Geschlechterunterschiede in der Sterblichkeit nach Diagnose von Herzerkrankungen werden durch die neuen Daten für 2016 bestätigt (1). Bei Patienten mit einem akuten MI ist eine sofortige Wiederherstellung des Blutflusses mittels Notfall-PCI, Stent und/oder entsprechender Medikation immer noch die wirkungsvollste therapeutische Methode zur Verbesserung der Prognose des Patienten. Eine pharmakologische Intervention, die kurz vor der Reperfusion eingesetzt werden kann (auch pharmakologische Postkonditionierung genannt), um myokardiale Infarkte zu reduzieren, ist von großem klinischen Interesse. Etwaige Therapiestrategien sind wesentlich für die Reduktion einer Myokardnekrose. Abhängig von der Dauer der Ischämie und der reperfusionsbedingten Zellschädigung kann mit diesen Therapiestrategien die Entstehung einer Infarktnarbe nicht immer vermieden werden. Insbesondere die Zeit, die bis zur Wiedereröffnung des Infarktgefäßes vergeht, entscheidet über den Verlust von vitalem Myokardgewebe. Die aus Ischämie und Reperfusion resultierende Gewebeschädigung setzt sich demnach aus zwei unterschiedlichen Bestandteilen zusammen. Zum einen trägt der letale Kardiomyozytenschaden, der durch Sauerstoff- und Substratmangel in der Ischämie bedingt ist, zum Endresultat entscheidend bei. Zum anderen ist der Reperfusionsschaden relevant, der durch das Wiedereröffnen des Gefäßes verursacht wird. Da der Reperfusionsschaden erst mit Eröffnen des Gefäßes auftritt, kann dieser durch Applikation geeigneter Substanzen zu Beginn der Reperfusion vermindert werden. Die Wirksamkeit therapeutischer Ansätze, die auf den Reperfusionsschaden abzielen, sinkt allerdings mit andauernder Ischämiezeit (62). In diesem Fall steigt der Anteil des ischämisch bedingten Zelltodes an.

In den letzten Jahrzehnten stand die Erforschung der schützenden Signalkaskade, vermittelt durch ischämische Präkonditionierung (IPC) und Postkonditionierung (IPost), im Mittelpunkt vieler Studien. Während die IPC durch kurze repetitive Ischämie/Reperfusionszyklen vor der lang andauernden Ischämie zur Reduktion der Infarktgröße führt, werden bei der IPost kurze Ischämie/Reperfusionsphasen nach der langen Ischämiephase durchgeführt, was einen vergleichbar starken Schutz des Herzens bewirkt. Aufgrund der höheren klinischen Relevanz

trat IPost und pharmakologische Postkonditionierung in den Mittelpunkt der Forschung. Deshalb existieren genügend Nachweise, dass IPC und IPost sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede aufweisen. Es wird angenommen, dass IPC und IPost die gleichen Signalelemente verwenden, jedoch über unterschiedliche Mechanismen wirken (63). Ein Signalelement, dem sowohl in der Präkonditionierung wie auch in der Postkonditionierung eine entscheidende Rolle zukommt, ist cGMP. cGMP ist ein intrazellulärer Botenstoff, der über lösliche und partikuläre Guanylatzyklen, sGC und pGC, gebildet werden kann. Stickstoffmonoxid stimuliert sGC, natriuretische Peptide (NP) – ANP, BNP, CNP - aktivieren die verschiedenen pGC. sGC und pGC sind in unterschiedlichen Organsystemen lokalisiert, womit funktionelle Unterschiede dieser verschiedenen Guanylatzyklen zu erklären sind. cGMP kann verschiedene Zielmoleküle anregen, unter anderen cGMP-abhängigen Proteinkinaseen (PKG), die die meisten protektiven cGMP-Effekte vermitteln. Schließlich wird cGMP durch cGMP-spezifische Phosphodiesterasen, primär PDE-5 und PDE-9, hydrolysiert und dadurch der cGMP-Spiegel reguliert.

Die vorliegende Arbeit soll zum allgemeinen Verständnis über die Rolle des intrazellulären Botenstoffes cGMP nach Ischämie/Reperfusionsschaden beitragen. Hierfür wurde zum einen die Erhöhung des cGMP Spiegels durch Aktivierung der sGC in einem bereits etablierten Tiermodell untersucht, welches die Untersuchung potentiell kardioprotektiver Substanzen im stimulierten Herzinfarkt ermöglicht. Zum anderen sollte die mögliche Inhibition des zellulären Exports von cGMP im Zellmodell betrachtet werden.

4.1 Rolle von sGC Aktivatoren während der Reperfusion

Die Aktivierung der sGC und die damit verbundene Freisetzung von cGMP ist, wie bereits erwähnt, ein bedeutender Schritt in der frühen Phase der Reperfusion. Die Regulation des cGMP-Spiegels stellt einen potentiellen Angriffspunkt für die pharmakologische Postkonditionierung dar. Phosphodiesterasen hydrolysieren die Phosphodiesterbindung der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP, welche als sekundäre Botenstoffe für verschiedene zelluläre Funktionen dienen (64). Die Inhibition der Phosphodiesterasen bewirkt eine Akkumulation von cAMP und/oder cGMP, abhängig von der jeweiligen Substratspezifität des Isoenzym. Die PDE-5 metabolisiert vorrangig cGMP. Zur Verwendung der PDE-5-Inhibitoren im Bereich der Myokardprotektion gegen Ischämie/Reperfusionsschäden kam es, da gezeigt wurde, dass die Gabe von cGMP-Analoga die Infarktgröße signifikant reduzieren kann (65). 2002 fanden Ockaili et al. heraus, dass der PDE-5-Inhibitor Sildenafil einen kardioprotektiven

Effekt ausüben kann. Dadurch konnte gezeigt werden, dass Sildenafil eine infarktverkleinernde Wirkung besitzt, wenn es vor der Ischämie verabreicht wird (66). 2007 zeigten Ravipati et al., dass auch die PDE-5-Inhibitoren Vardenafil und Tadalafil, ähnlich dem Sildenafil, präkonditionierend wirken (67). In der Folge wurde herausgefunden, dass Sildenafil und Vardenafil auch kardioprotektiv wirken, wenn sie während der Reperfusion verabreicht werden (32).

Die oben angeführten Ergebnisse zeigen, dass die Modulation des intrazellulären cGMP-Spiegels mittels PDE-Inhibitoren kardioprotektiv wirkt. Neben der Inhibition des Abbaus, kann auch die Modifikation der cGMP Synthese als möglicher Ansatzpunkt für potentiell schützende Interventionen herangezogen werden. Ein Teil dieser Arbeit untersuchte deshalb die Effekte des NO unabhängigen sGC Aktivators BAY 58-2667 auf die Infarktgröße in einem Ischämie/Reperfusionsmodell. Ein weit verbreitetes Modell zur Untersuchung des akuten Myokardinfarktes stellt die Langendorff Methode dar, bei der isolierte Herzen retrograd mit einer Nährstofflösung perfundiert werden. Dadurch kann der Einfluss potentiell schützender Substanzen auf die Infarktgröße getestet werden. Im Vergleich zur *in vivo* Methode bietet diese *ex vivo* Methode den Vorteil des geringeren technischen Aufwandes, geringerer Kosten und die leichte Entnahme von Biopsieproben zur Untersuchung von Proteinleveln der postulierten Signalkaskade. Des Weiteren können mit dieser Methode Herzen alleine, ohne die Beeinflussung anderer Organe oder Hormone, untersucht werden. Allerdings enthält die Nährstofflösung meist nur Elektrolyte und Glukose und keine essentiellen Substrate, wie Aminosäuren und Fettsäuren.

In dieser Arbeit wurden isolierte Rattenherzen zur Untersuchung des potentiell schützenden Effekts des sGC Aktivators BAY 58-2667 verwendet. Zum Zeitpunkt der Untersuchung war diese Studie die erste, die diese Substanz als klinisch relevanten Kardioprotektor untersuchte. Der Einsatz von BAY 58-2667 vor Beginn der Reperfusionsphase reduzierte die Infarkte in isolierten Rattenherzen signifikant. Diese Ergebnisse wurden auch durch Experimente an *ex vivo* und *in situ* Hasenherzen bestätigt (68). Die sGC generiert cGMP, welches im Umkehrschluss die PKG aktiviert. Tatsächlich erhöht BAY 58-2667 die cGMP Konzentration im ventrikulären Gewebe. Der durch BAY 58-2667 vermittelte Schutz wurde durch den PKG Inhibitor KT-5823 aufgehoben. Das weist darauf hin, dass die PKG an dem, durch BAY 58-2667, vermittelten Schutz des Herzens vor einer Schädigung nach MI beteiligt ist. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die Aktivierung von PKG den mK_{ATP} -Kanal öffnet. Dieser Mechanismus wurde im Rahmen dieser Arbeit bestätigt, da 5-HD, ein vermeintlicher selektiver mK_{ATP} -Kanal Antagonist, den durch BAY 58-2267 vermittelten

Schutz blockierte. Somit kann festgestellt werden, dass BAY 58-2667 durch die Aktivierung von PKG und die Öffnung des mK_{ATP} -Kanals, ähnlich dem Effekt ischämischer Präkonditionierung, den Myokardschutz vermittelt. Weitere Studien haben gezeigt, dass ein direkter PKG Aktivator, gegeben bei der Reperfusion, ebenfalls die Infarktgrößen reduzieren kann und somit schützt (69). Entdeckt wurde, dass beim Öffnen des mK_{ATP} -Kanals ROS gebildet und die PKC aktiviert wird. Der Wiedereinstrom von Sauerstoff während der Reperfusion würde die Generierung weiterer reaktiver Sauerstoffspezies fördern. Die nachfolgende Aktivierung der PKC in der Reperfusion würde dazu führen, dass Überlebenskinasen aktiviert werden, was wiederum zum Schutz des Herzens vor Infarktschädigung führt.

BAY 58-2667 wurde entwickelt, um die NO- und häm-unabhängige sGC in der Region der Amino-Säure 371 (alpha Untereinheit) und 231-310 (beta Untereinheit) zu aktivieren. Die niedrige Konzentration von 1 nM BAY 58-2667 aktivierte die sGC ausreichend, um die intrazelluläre cGMP Konzentration biochemisch relevant zu erhöhen (70). Es wurden keine Konzentrationen unter 1 nM getestet, da weitere *in vivo* Studien zeigten, dass die Plasmakonzentration von 65 nM bereits niedrig war und keine hämodynamischen Effekte auftraten. Der NOS Inhibitor L-NAME bewirkte keine Hemmung des, durch BAY 58-2667, vermittelten Schutzes. Dieses bestätigt eine NO-unabhängige Aktivierung der PKG. Die aktivierte sGC ist bekannt dafür, cGMP zu generieren. Dies wiederum löst, vermittelt durch PKG, verschiedene physiologische Effekte aus. In diesem Versuch erhöhte BAY 58-2667 das cGMP-Niveau in reperfundierten kardialen Gewebe, doch zeigte es keinen Einfluss auf den intrazellulären cAMP-Spiegel. Eine beteiligende Rolle von cAMP das cGMP-Niveau zu regulieren, kann hierbei nicht ausgeschlossen werden, weil es diverse Überlagerungen zwischen cGMP und cAMP auf dem Affinitätslevel von PDEs gibt (71). Allerdings scheint erhöhtes cGMP der entscheidende Faktor zu sein, der den BAY 58-Anti-Infarkt-Effekt bewirkt. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass der PKG Inhibitor KT-5823 den Schutz von BAY 58-2667 in isolierten Rattenherzen aufgehoben hat. Obwohl es in der Literatur Diskussionen über die Selektivität von KT-5823 gibt, war zum Zeitpunkt dieser Arbeit kein anderer spezifischer PKG Inhibitor bekannt, der hier Verwendung finden konnte. Die Darstellung der Aktivität der PKG in Abhängigkeit von der Menge an cGMP innerhalb des gleichen Gewebes wäre der nächste analytische Schritt, um die Rolle der PKG deutlicher darzulegen. Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit war die zeitgleiche Bestimmung der Aktivität der PKG in der gleichen Gewebeprobe nicht möglich. Die Phosphorylierung der VASP wurde als Maß der PKG-Aktivität verwendet, jedoch exprimieren Kardiomyozyten kein

VASP (72). Daher ist die cGMP Konzentration aktuell der beste Indikator für die Aktivität der PKG. Die Inhibition der cAMP-abhängigen Kinase PKA durch den konventionell genutzten Inhibitor H89 hätte ebenfalls Rückschlüsse auf die Bedeutung von cGMP in der Signalkaskade liefern können. Dieser Inhibitor ist jedoch ungeeignet, da er kardioprotektive Eigenschaften besitzt, welche anscheinend nicht im Zusammenhang mit der PKA Inhibition stehen (73). Wie bereits erwähnt, führt die Aktivierung der PKG zur Öffnung des mK_{ATP} -Kanals, was als wichtiger Schritt der Signalkaskade zum Triggern der Präkonditionierung erachtet wird (74). Diese Annahme konnte durch die Gabe des zellpermeablen cGMP-Analogons 8-(4-chlorophenyltio)-Guanosin 3', 5'-zyklischmonophosphat, bestätigt werden, welches vor der Reperfusion Kaninchenherzen verabreicht wurde und zur Reduktion der Infarktgröße führte. Dieser Schutz konnte mittels zwei bekannter Blocker des mK_{ATP} -Kanals, 5-HD und Glibenclamid, verhindert werden (69). Somit wurde gezeigt, dass das Öffnen des mK_{ATP} -Kanals, vermittelt über die PKG, auch in der Reperfusion schützen kann.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass auch der schützende Effekte von BAY 58-2667 durch 5-HD aufgehoben werden kann. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die PKG und der mK_{ATP} -Kanal Schlüsselstellen im schützenden Signalweg sind. Zweifelsohne sind weitere Untersuchungen notwendig, um herauszufinden, welche genaue Rolle der Kanal in der protektiven Signalkaskade spielt. Schlussendlich soll nicht unerwähnt bleiben, dass es einige Kritiken über die Spezifität von 5-HD als Antagonisten des mK_{ATP} -Kanals gibt (75).

Vorangegangene Arbeiten zeigten, dass der Umfang des kardialen Schutzes während der Reperfusion stark abhängig ist vom Zeitpunkt, wann die Intervention durch einen postkonditionierenden Stimulus, pharmakologisch (76) oder ischämisch (77), einsetzt. So kann schon eine Minute zu einem Verlust des erwarteten Schutzes führen. Daher ist es wichtig, BAY 58-2667 fünf min vor der Reperfusion zu geben, um die BAY 58-2667 Konzentration im Blut zu erhöhen. So kann das Blut beim Einsetzen der Reperfusion mit einer hohen BAY 58-2667 Konzentration in die ischämische Zone eindringen und wirken. Die in dieser Arbeit identifizierten Signalelemente des BAY 58-2667 vermittelten Myokardschutzes weisen darauf hin, dass der BAY 58-2667 vermittelte Myokardschutz durch die gleichen Signalelemente vermittelt wird, wie im Mechanismus der Präkonditionierung (78). Dies deutet darauf hin, dass durch die Verhinderung der schädlichen Strukturänderung der mitochondrialen permeablen Transition Pore, gerade in den ersten min der Reperfusion, der Schutz im Herzen erwirkt wird. Somit wäre eine frühe pharmakologische Behandlung notwendig, um die Poren vor einer Deformation zu schützen. Es wurde nicht getestet, ob eine spätere, vielleicht eine oder 2 min nach Beginn der Reperfusion, vorgenommene Gabe von BAY 58-2667 zu einem Verlust des

Schutzes führen würde. Doch kann vermutet werden, dass bei einer späteren Verabreichung von BAY 58-2667 die Plasma-Level, während der kritischen ersten Phase der Reperfusion, noch kein schützendes Ausmaß hätten.

Bei der Aktivierung der PKG kommt es zur Dilation von glatten Gefäßmuskelzellen. Es stellt sich die Frage, ob es möglich sei, das Herz, ohne ein inakzeptables Maß an peripherer Gefäßerweiterung, zu schützen. Der hämodynamische Effekt von BAY 58-2667 erwies sich während der Wirkstoffinfusion als kurzlebig und stellte sich als geringfügig heraus (68). Im *in situ* Hasenherz-Modell zeigte BAY 58-2667 eine Kardioprotektion mit einer moderaten Hypotension. Der Blutdruckabfall bei den Tieren, die mit einer geringen Dosis BAY 58-2667 infundiert wurden, war nicht signifikant. In dem Protokoll mit Infusionsraten geringer Konzentration wurden immer noch Plasma-Level von BAY 58-2667 produziert, die weit über den, der in isolierten Herzen stark schützenden Dosis von 50 nM BAY 58-2667, lagen. Daher sollte es möglich sein, den kardialen Schutz aufrechtzuerhalten, während die BAY 58-2667 Konzentration reduziert wird, um einen möglichen Abfall des Blutdruckes zu vermeiden.

BAY 58-2667 ist ein NO-unabhängiger sGC Aktivator, dessen hämodynamischer Effekt mit dem des biologischen Nitrat vergleichbar ist. Es konnte gezeigt werden, dass die intravenöse Gabe von BAY 58-2667 auch im Menschen (79) zu einer konzentrationsabhängigen nachhaltigen Hypotension führt. BAY 58-2667 aktiviert die hämfreie, oxidierte Form von sGC, welche nicht mehr von NO aktiviert werden kann und vor allem unter Bedingungen hoher ROS Konzentrationen vorhanden ist. Die gefäßweitende Eigenschaft von BAY 58-2667 scheint demnach auf bereits geschädigte Blutgefäße beschränkt zu sein, was BAY 58-2667 für klinische Interventionen als besonders geeignet erscheinen lässt (80). So wurde in Studien gezeigt, dass BAY 58-2667 sowohl die positiven Effekte der pulmonalen Hypertension zu reversieren vermag (81), als auch vaskuläre Atherosklerose, Stenoserezediven, Leberzirrhose und Nierenfibrose reduzieren kann (82). Des Weiteren wurde berichtet, dass die direkten sGC Aktivatoren, inklusive BAY 58-2667, im Tiermodell für Herzinsuffizienz die kardiale Vor- und Nachlast reduzieren (83). So wurde BAY 58-2667 bereits in klinischen Tests zur Langzeitbehandlung von Herzversagen untersucht (84). Hier konnte gezeigt werden, dass BAY 58-2667 in Patienten mit akutem Herzversagen die kardiale Vor- und Nachlast reduziert, dies jedoch mit der Nebenwirkung Hypotension in Verbindung stand. Dennoch bieten sGC Aktivatoren ein großes klinisches Potential, da diese dem oxidativen Stress im Rahmen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen entgegenwirken und somit hohes Potential für die Behandlung von Patienten mit Myokardinfarkt aufweisen.

4.2 cGMP Auswärtstransport mittels siRNA Technologie hemmen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von MRP 4 und MRP 5, welche zyklische Nucleotide transportieren, näher zu charakterisieren. Die Multidrug Resistance Proteine (MRPs) gehören zu einer Familie von Transmembranproteinen, die, die durch ATP-Hydrolyse erzeugte, Energie nutzen, um verschiedene endogene Verbindungen und Xenobiotika aus unterschiedlichen Zellen zu pumpen. Sie bilden die Klasse C der großen Familie der sogenannten ABC-Transporter. Die Mitglieder der ABCC-Unterfamilie waren früher als Multidrug Resistance Proteine bekannt, da sie in der Lage waren, Krebsmedikamente aus Zellen zu extrudieren. Daher beinhaltet ihre physiologische Rolle die Eliminierung von Medikamenten und körpereigenen Molekülen. Die ABC-Transporter enthalten vier Domänen: zwei membranübergreifende Domänen, die jeweils sechs Transmembran-Helikopter enthalten, und zwei zytoplasmatische Nucleotid-Bindungsdomänen. Die Bindungsdomänen enthalten Walker A- und B-Motive und ein LSGGQ-Motiv, das spezifisch für ABC-Transporter ist. Walker-Domänen sind an der Bindung und Hydrolyse von zwei ATP-Molekülen beteiligt. Einige ABCC-Transporter haben eine NH₂-terminale Erweiterung mit einem extrazellulären N-Terminus, einer dritten membranübergreifenden Domäne und einer intrazellulären Schleife und werden daher als lange MRPs betrachtet. ABCC 4/5 sind die am besten charakterisierten kurzen ABCCs. Ihre Gene sind hoch polymorph und führen durch alternatives Spleißen zu MRP-Isoformen. Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der ABCC-Unterfamilie haben ABCC 4/5 eine Besonderheit: Entweder sind sie auf die apikale oder auf die basolaterale Membran polarisierter Zellen lokalisiert. ABCC 4/5 sind in einer Vielzahl von Zellen vorhanden, wenn auch schwach exprimiert (46–48). ABCC 4/5 sind in der Lage, zyklische Nucleotide zu pumpen, die mehrere kardiovaskuläre Prozesse steuern, einschließlich der Herzhypertrophie, der Herzkontraktilität, der Myokardfibrose, der Endothel-Barrierefunktion, die Proliferation von glatten Muskelzellen und der Vasodilatation (48, 85). Ebenso ist die zyklische Nucleotidhomöostase unerlässlich, um die Blutplättchen in einem inaktiven Zustand zu halten. So wird eine unangemessene Aktivierung und Gerinnungsbildung vermieden. In einigen pathophysiologischen Situationen oder medikamentösen Langzeitbehandlungen kann eine ABCC 4-Überexpression auftreten (86). So wurde beispielsweise in der Leber von Ratten und Menschen mit obstruktiver Cholestase ABCC 4 hochreguliert, um Gallensalze im Überschuss zu eliminieren (87). Die induzierbare Expression von ABCC 4 wurde auch durch Anti-Hepatitis-Virus-Medikamente, wie beispielsweise Nucleosidanaloga, nachgewiesen. Im Einklang damit erhöhte die ABCC 4-Überexpression den Ausfluss von Molekülen und sorgte für Arzneimittelresistenz (88).

In Rattenherzen sind ABCC 4/5 exprimiert, was in dieser Arbeit durch die Westernblot und Immunfluoreszenz Analyse gezeigt werden konnte. ABCC 4/5 konnten darüber hinaus auch im Herzen der Maus und des Menschen detektiert werden (89, 90). ABCC 5 konnte in isolierten Rattenkardiomyozyten nachgewiesen werden, was durch eine Vielzahl von Studien auch für ABCC 4 bestätigt werden konnte (48, 90).

Das wachsende Interesse an ABCC 4/5 in der kardiovaskulären Medizin ergibt sich aus der Beschreibung, dass für die kardiovaskuläre Homöostase und Thrombozytenfunktion verantwortliche Schlüssel-moleküle, Substrate für ABCC 4 und 5 sind. ABCC 4/5 transportieren Signalmoleküle wie cAMP und cGMP und sind am aktiven Transport von verschiedenen Medikamenten, vor allem Nukleosidanaloga, Antibiotika und antineoplastischen Mittel, beteiligt.

In ischämischen Herzen konnte interessanterweise eine erhöhte ABCC 5-Expression festgestellt werden. Es wurde angenommen, dass dieser Anstieg in Zusammenhang mit einem erhöhten cGMP Spiegel und der damit notwendigen Regulation des cGMP Levels während der ischämischen Präkonditionierung steht. Bereits in 2002 wurde von Sampath et al. postuliert, dass cNMP einen direkten Einfluss auf den Expressionslevel von ABCC 4 und 5 haben (91).

Die Regulation von endogenen Substraten und der mögliche Eingriff in physiologische Regulationsmechanismen im Herzen bildeten die Basis für die Charakterisierung von ABCC 4/5 in dieser Arbeit. Es wurde die Expression und die Lokalisation der Transporter im Herzen untersucht. Hierzu wurde Rattenherzgewebe, kardiale Zelllinien und frisch isolierte adulte Rattenkardiomyozyten untersucht. Das Expressionsniveau wurde auf mRNA-Ebene (ABCC 4/5) und Protein-Ebene (ABCC 4) bzw. mit Hilfe der Immunfluoreszenz (ABCC 5) analysiert. Prozesse der Genregulation können extern durch das Einbringen synthetischer siRNA-Moleküle beeinflusst werden (92). Es gibt dabei verschiedene Möglichkeiten, die Einführung des fremden genetischen Materials in eukaryotische Zellen zu realisieren. Zum einen per Mikroinjektion, einem physikalischen Verfahren, im Zuge dessen das genetische Material direkt in den Zellkern oder die Zelle injiziert wird. Das physikalische Verfahren bringt einen sehr großen apparativen Aufwand mit sich und stellte für unsere AG keinen realisierbaren Lösungsansatz dar. Zum anderen das chemische Verfahren der Lipofektion, bei der das Material, in spezielle Lipide (Liposomen) eingebettet, in die Zellen eingebracht wird. Die Transfektion via Lipofektion an sich war erfolgreich. Die Möglichkeiten funktioneller Tests waren sehr begrenzt. Die Suppression der Transporterexpression ging mit der Passagierung der Zellen verloren (Daten nicht gezeigt). Eine permanente Suppression der ABCC-Transporter auf mRNA- und Proteinebene war von entscheidender Bedeutung, um die Regulierung des

intrazellulären cGMP Spiegels und die damit verknüpfte Fragestellung nach dem kardioprotektiven Potential des sekundären Botenstoffes zumindest in Teilen zu beantworten. Daher wurde eine weitere Methode, ebenfalls auf siRNA-Technologie basierend, ausgewählt. Auch dabei wird die Translation einer spezifischen mRNA in das entsprechende Protein unterbunden. Folglich ist auch die Aktivität des Proteins vermindert. Wie bereits erwähnt ist die siRNA (small interfering RNA) ein Bestandteil eines zelleigenen Systems zur Regulierung von Genen, der sogenannten RNAi (RNA-Interferenz). Physiologisch dient dieser evolutionär hoch konservierte Prozess dazu, durch posttranskriptionale Suppression die Expression von Genen zu steuern (93). Dabei erfolgt die Generierung der siRNA durch Degradierung von dsRNA (doppelsträngige RNA) mittels RNase-III-Endonukleasen, sogenannte Dicer-Enzyme (94, 95). Die entstandenen Fragmente von 21-23 bp Nukleotid-Länge (= siRNA) werden unter ATP-Verbrauch mit Hilfe von Helicasen entwunden und als Einzelstrang in den Nuklease-Komplex RISC (RNA induced silencing complex) überführt, wodurch dieser aktiviert wird (96, 97). Durch den Einbau des siRNA-Stranges wird der RISC-Komplex für die homologe mRNA spezifiziert. Aus der komplementären Anlagerung und einer folgenden endonukleotidische Spaltung resultiert ein „Abschalten“ (96, 98). Dadurch kann die Translation in das entsprechende Protein gezielt gehemmt werden. Nach dem begrenzten Erkenntnisgewinn via Lipofektion wurde diese biologische Methode des retroviralen Gentransfers zum Einbringen der siRNA in die Zielzellen angewendet. Sie bringt den Vorteil, dass die Zellen nach einmaliger Transfektion die siRNA stabil exprimieren, also eine permanente Hemmung des entsprechenden Proteins erreicht wird. Die transfizierten Zellen können in Kultur gehalten und für die geplanten Versuche verwendet bzw. kryokonserviert werden. Der Vorgang der viralen Transfektion ist verträglicher als andere Methoden und die Zellen haben eine höhere Überlebensrate. Transfizierte Zellen zeigen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen meist eine ähnliche Viabilität, ähnliches Wachstumsverhalten und einen ähnlichen DNA-Gehalt in den Zelllysaten. Die verwendeten Retroviren stellen eine besondere Art von Viren dar, weil ihre genetische Information als RNA vorliegt, aber als DNA ins Genom der Wirtszelle eingebaut wird. Nach dem Einbringen der RNA in die Zelle wird sie durch das virale Enzym Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben und ins Wirtszellgenom integriert. Retroviren befallen in der Regel nur teilungsaktive, eukaryotische Zellen. Der in dieser Arbeit eingesetzte retrovirale Vektor ist ein Plasmid, das aus doppelsträngiger DNA besteht. Er basiert auf dem bicistronischen, selbstinaktivierenden Expressionsvektor pQCXIH und ist selbst nicht replikationsfähig. Die enthaltenen codierenden Sequenzen für eine Ampicillin- bzw. Hygromycin-Resistenz sorgen dafür, dass nur Bakterien (während der Vermehrung der

Plasmid-DNA) oder Zellen (während der Virusproduktion) überleben können, die das Plasmid in ihr Genom integriert haben. Durch die Arbeitsgruppe um Herrn Roskopf wurden zusätzlich ein H1-Promotor (zur laufenden Ablesung der eingefügten siRNA-Sequenzen) und ein Abschnitt für das pEGFP-C1 (zur Kontrolle der Transfektionseffizienz) in den Vektor eingefügt. Eine Infektion von Verpackungszellen allein mit diesen Vektoren führt nicht zur Bildung von kompletten Viren. Ihnen fehlt eine codierende Sequenz für die Hüllproteine eines Virus. Erst durch eine Kotransfektion der Verpackungszelllinie mit dem Vektor pVSV-G wurden infektiöse Viren generiert. Dieser Vektor codiert die Information für die Hüllproteine (*env*) des VSV-Virus. Die verwendete Verpackungszelllinie GP2-293 hat in ihrem Genom die Sequenzen für die entsprechenden *gag*- und *pol*-Proteine integriert, die zur Produktion vollständiger Viren benötigt werden. Die Oligonukleotide, die für die ABCC 4 und ABCC 5-spezifische siRNA codieren, wurden mit Hilfe der *Dharmacon* Website für siRNA-Design ausgewählt. Nach erfolgter Transfektion wurde die Suppression von ABCC 4 und 5 auf verschiedenen Expressionsebenen analysiert. Auf mRNA-Ebene konnte mittels quantitativer RT-PCR eine unterschiedlich starke Abnahme der Expression von ABCC 4 und 5 in den mit verschiedenen siRNAs transfizierten Zellen beobachtet werden. Wir konnten einen drastischen Abfall der ABCC 4-mRNA in den Lysaten der mit V5 si1-19 transfizierten und einen deutlichen Abfall der ABCC 5-mRNA (4.Passage) in den Lysaten der mit V5 si3-10 transfizierten A7r5 Zellen im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen (V5 Ko) erreichen. Während der Passagierung der A7r5 Zellen, verbunden mit der Hygromycinselektion, fiel auf, dass die Zelllinie nicht robust genug war. Immer wieder dünnte die Zelldichte aus, gefolgt vom Niedergang aller Zellen in den Kulturflaschen. Parallel mitgeführte Zellen ohne virale Transfektion belegten, dass es sich nicht um praktische Fehler handelte. Aus diesem Anlass wurde eine weitere Rattenzelllinie genutzt, um die Methode zu verifizieren. Die Leberzelllinie H4IIE (freundlicherweise von der AG Krömer zur Verfügung gestellt) exprimiert die Transporter stärker und sollte die nötige Robustheit für das Protokoll der Antibiotikaselektion nach viraler Transfektion mitbringen. In Passage 4 der mit V5 si1-19 transfizierten H4IIE Zellen ist der drastischste Abfall der ABCC 4 mRNA im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen zu erkennen. Bei den mit V5 si3-10 transfizierten Zellen war in der 4. Passage eine deutliche Senkung von ABCC 5 zu verzeichnen. Diese Unterschiede blieben auch auf Proteinebene bestehen, so dass geschlossen werden kann, dass verschiedene siRNA-Sequenzen zu einer unterschiedlich starken Suppression des Zielproteins führen. Die viral eingebrachten siRNA Sequenzen V5 si1-19 (ABCC 4) und V5 si3-10 (ABCC 5) erwiesen sich in Hinblick auf die Suppression von ABCC 4 und 5 als besonders effizient. Somit waren diese

Sequenzen gut geeignet, die Konsequenzen der Transportersuppression in den Zellen zu untersuchen.

Funktionelle Analysen

Um die Konsequenzen spezifischer Suppressionen von Transportern in Zellen zu untersuchen, wurden im nächsten Teil der Arbeit funktionelle Analysen nach viraler Transfektion von H4IIE-Zellen durchgeführt. Hierbei wurden zunächst in Vorversuchen die Versuchsparameter für die Zelllinie optimiert. Es wurde mittels des Zytotoxizitätstests Alamar Blue die optimale Konzentration der Zytostatika Mercaptopurin und Thioguanin für die funktionellen Assays ermittelt. Hierbei stellte sich eine weitgehende Unempfindlichkeit der H4IIE-Zellen gegenüber Mercaptopurin heraus. Beim Alamar Blue-Assay handelt es sich um einen Zytotoxizitätstest, der eine Aussage über die Proliferationshemmung in Kombination mit dem Absterben der Zellen ermöglicht.

Alamar Blue-Assay

Nachfolgende Suppressionsversuche sollten nun den Einfluss der Suppression von ABCC 4 und ABCC 5 auf die Sensitivität der H4IIE Zellen nach Thioguaninapplikation darstellen. Hier konnte sowohl bei den supprimierten, als auch bei den unbehandelten Zellen keine dosisabhängige Abnahme der Zellviabilität dargestellt werden. Zunächst lag die Annahme nahe, dass der Alamar Blue-Assay eine zu geringe Empfindlichkeit gegenüber apoptotischen Zellen zeigte.

Nachfolgende Studien in isolierten Kardiomyozyten von Mäusen mit geringerem ABCC 4 Spiegel zeigten bei Behandlung mit Isoproterenol eine gesteigerte Bildung von cAMP (90). Das gleiche Ergebnis wurde in isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten, die mit einem ABCC 4 Inhibitor behandelt wurden, gefunden (89). Beide Studien zeigten also eine erhöhte Kontraktilität der Kardiomyozyten, bewirkt durch vermehrte Bildung von cAMP. Eine dauerhafte Aktivierung von PKA durch eine erhöhte cAMP Konzentration führt somit zur Schädigung des Herzens. Der Export von cAMP durch ABCC 4 ist daher ein entscheidender Prozess, da extrazelluläres cAMP eine Signalkaskade auslöst, die das Herz wiederum vor Hypertrophie und Fibrose schützt, was nachweislich in anderen Geweben ebenfalls eine wichtige Rolle spielt (85).

In dieser Arbeit wurden die ABCC Transporter einzeln ausgeschaltet, um deren Einfluss auf den cAMP bzw. cGMP Transport zu testen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Aktivität der ABCC Transporter von anderen Proteinen abhängig ist. Für ABCC 4 konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition von ABCC 4 und der Phosphodiesterase notwendig ist, um

die Bildung von Thromben durch Aktivierung der Blutplättchen zu blocken (99). ABCC 4 spielt also eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von Blutplättchen, was einen Angriffspunkt für antithrombotische Arzneimittel darstellt und daher von hohem klinischen Interesse ist. Auch eine gemeinsame Beteiligung von mehreren ABCC Transportern am Export von cAMP und cGMP kann nicht ausgeschlossen werden. Weiterführende Studien sind notwendig, um den Wirkungsmechanismus des Exportes von cNMP durch ABCC Transporter genauer zu charakterisieren. Die vorliegende Arbeit liefert somit einen Beitrag zum Verständnis der Regulationsmechanismen von cNMP und Inhibitoren der ABCC Transporter. Sie stellen mögliche Ansatzpunkte für klinische Interventionen nach Myokardinfarkt dar.

5 Zusammenfassung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehören heute zu den Hauptursachen für Tod und Invalidität in den Industrie- und Entwicklungsländern. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation betrug die Zahl der durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachten Todesfälle im Jahr 2016 17,9 Millionen. Das umfasst mehr als 31 % aller weltweiten Todesfälle, die zu 85 % auf einen Herzinfarkt bzw. Schlaganfall zurückzuführen sind.

Für das Outcome der Patienten nach einem Myokardinfarkt ist die Größe der Infarktnarbe von prognostischer Bedeutung. Nach therapeutischer Rekanalisation des betroffenen Herzkranzgefäßes entsteht durch diesen aktiven Prozess eine Myokardnarbe. Durch Perfusionsmanöver oder die Gabe verschiedener Pharmaka, vor wie nach einem Infarkt, lässt sich die Ausprägung der Narbe beeinflussen und die Größe der Narbe reduzieren. Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, dass die Gabe eines PDE-5-Inhibitors zu einem intrazellulären Anstieg des cGMP-Levels und zum Myokardschutz führt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des second Messengers cGMP in der postulierten Signalkaskade der Postkonditionierung weiter zu untersuchen. Dazu kamen zwei Verfahren zur Modulierung des cGMP Spiegels nach einem Myokardinfarkt zur Anwendung: zum einen die gezielte Steigerung der Synthese von cGMP und zum anderen die Inhibition eines möglichen Auswärtstransports des Moleküls via ABC-Transporter.

In *ex-vivo* perfundierten Rattenherzen konnte gezeigt werden, dass BAY 58-2667 im hohen Maße protektierend auf das ischämische Herz wirkt, wenn es direkt vor der Reperfusion verabreicht wird. Dieser Schutz ist unabhängig von NO, steht jedoch in Abhängigkeit von zwei weiteren Elementen der untersuchten Signalkaskade, der PKG und dem mK_{ATP} -Kanal. Die Infusion von BAY 58-2667 führte zur Erhöhung der intrazellulären cGMP Level im kardialen Gewebe und ist darüber hinaus mit einem akzeptablen hämodynamischen Profil verbunden.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Modulation der intrazellulären cGMP Konzentration durch Suppression entsprechender Auswärtstransporter. Durch den Einsatz einer speziellen siRNA-Technologie sollte deren Expression inhibiert werden. Die spezifisch gegen ABCC 4 und 5 gerichteten siRNAs wurden durch einen retroviralen Vektor in die Zellen eingebracht, was eine effektive Suppression des Proteins auf mRNA- und Proteinebene zur Folge hatte. Dabei zeigte das Ergebnis auf, dass die retrovirale Transfektion von siRNA eine geeignete Möglichkeit zur gezielten Ausschaltung von ABCC 4 und 5 sein kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern wichtige mögliche Ansatzpunkte für die pharmakologische Behandlung von Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt. Die gezielte

Steuerung des cGMP Spiegels deutet ein großes klinisches Potential an. Der Einsatz von BAY 58-2667 erwies sich im Hinblick auf die Limitierung der Infarktgröße in der Reperfusion im Menschen als vielversprechend.

6 Literaturverzeichnis

1. Herzstiftung D. Deutscher Herzbericht 2018 2018.
2. French JK, White HD. Clinical implications of the new definition of myocardial infarction. *circulation*; 2004;90;99-106.
3. Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev* 2007; 59(4):418–58.
4. Downey JM, Cohen MV. Reducing infarct size in the setting of acute myocardial infarction. *Prog Cardiovasc Dis* 2006; 48(5):363–71.
5. Yellon Derek M., Hausenloy Derek J. Myocardial Reperfusion Injury. *The New England J of Med* 2007:1121–35.
6. Hearse DJ, Humphrey SM, Chain EB. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1973:395–407.
7. Inverte Jea. The Role of Na⁺-H⁺ Exchange Occuring during Hypoxia in the Genesis of Reoxygenation-induced Myocardial Oedema. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*; 1997:1167–75.
8. Piper HM, Balsler C, Ladilov YV, Schäfer M, Siegmund B, Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado. The role of Na⁺/H⁺ exchange in ischemia-reperfusion. *Basic Res Cardiol* 1996:191–202.
9. Hausenloy D. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2003; 35(4):339–41.
10. Kalogeris T, Bao Y, Korthuis RJ. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol* 2014; 2:702–14.
11. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *circulation*; 1986:1124–36.
12. Cohen MV, Downey JM. Adenosine: trigger and mediator of cardioprotection. *Basic Res Cardiol* 2008; 103(3):203–15.

13. Tong H, Chen W, Steenbergen C, Murphy E. Ischemic Preconditioning Activates Phosphatidylinositol-3-Kinase Upstream of Protein Kinase C. *Circ Res*; 2000:309–31.
14. Oldenburg O, Qin Q, Krieg T, Yang X-M, Philipp S, Critz SD et al. Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoK_{ATP} channel opening and leads to cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286(1):H468-76.
15. Qin Q, Yang X-M, Cui L, Critz SD, Cohen MV, Browner NC et al. Exogenous NO triggers preconditioning via a cGMP- and mitoK_{ATP}-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287(2):H712-8.
16. Salloum FN, Ockaili RA, Wittkamp M, Marwaha VR, Kukreja RC. Vardenafil: a novel type 5 phosphodiesterase inhibitor reduces myocardial infarct size following ischemia/reperfusion injury via opening of mitochondrial K(ATP) channels in rabbits. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2006; 40(3):405–11.
17. Baines CeaP. Oxygen Radicals Released During Ischemic Preconditioning Contribute to Cardioprotection in the Rabbit Myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1997:207–16.
18. Ambrosio* G, Tritto I, Chiariello M. The Role of Oxygen Free Radicals in Preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 1995:1035–9.
19. Hausenloy DJ, Wynne AM, Yellon DM. Ischemic preconditioning targets the reperfusion phase. *Basic Res Cardiol* 2007; 102(5):445–52.
20. Cohen MV, Philipp S, Krieg T, Cui L, Kuno A, Solodushko V, et al. Preconditioning-mimetics Bradykinin and DADLE Activate PI3- kinase Through Divergent Pathways. *J Mol Cell Cardiol* 2007:842–51.
21. PARSONS M, YOUNG L, LEE JE, JACOBSON KE, LIANG BT. Distinct cardioprotective effects of adenosine mediated by differential coupling of receptor subtypes to phospholipases C and D. *FASEB J* 2000:1423–31.
22. Solenkova NV, Solodushko V, Cohen MV, Downey JM. Endogenous adenosine protects preconditioned heart during early minutes of reperfusion by activating Akt. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290(1):H441-9.
23. Juhaszova M, Zorov DB, Kim S-H, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW et al. Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J. Clin. Invest.* 2004; 113(11):1535–49.

24. Kaljusto M-L, Mori T, Mohammad Husain Rizvi S, Galagudza M, Frantzen M-L, Valen G et al. Postconditioning in rats and mice. *Scand Cardiovasc J* 2006; 40(6):334–41.
25. Darling CE, Jiang R, Maynard M, Whittaker P, Vinten-Johansen J, 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):H1618-26.
26. Yang X-M, Philipp S, Downey JM, Cohen 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.
27. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 2004; 61(3):448–60.
28. Penna C, Mancardi D, Tullio F, Pagliaro P. Postconditioning and intermittent bradykinin induced cardioprotection require cyclooxygenase activation and prostacyclin release during reperfusion. *Basic Res Cardiol* 2008; 103(4):368–77.
29. Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, Raimondo S, Cappello S, Gattullo D et al. 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):180–9.
30. Yang X-M, Krieg T, Cui L, Downey JM, Cohen MV. NECA and bradykinin at reperfusion reduce infarction in rabbit hearts by signaling through PI3K, ERK, and NO. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2004; 36(3):411–21.
31. Gross ER, Hsu AK, Gross GJ. Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts. *Circ Res* 2004; 94(7):960–6.
32. Maas O, Donat U, Frenzel M, Rütz T, Kroemer HK, Felix SB, Krieg T. Vardenafil protects isolated rat hearts at reperfusion dependent on GC and PKG. *British J of Pharmacology* 2008:25–31.
33. Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 2006; 58(3):488–520.

34. Cohen MV, Yang X-M, Liu Y, Solenkova NV, Downey JM. Cardioprotective PKG-independent NO signaling at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 299(6):H2028-36.
35. Salloum FN, Takenoshita Y, Ockaili RA, Daoud VP, Chou E, Yoshida K-i et al. Sildenafil and vardenafil but not nitroglycerin limit myocardial infarction through opening of mitochondrial K(ATP) channels when administered at reperfusion following ischemia in rabbits. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2007; 42(2):453–8.
36. Pagliaro P., Rastaldo R., Penna C., Mancardi D., Cappello S., Losano G. Nitric oxide (NO)-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway is involved in ischemic postconditioning in the isolated rat heart. *circulation*:1–110.
37. Tamargo* J, Amorós I, Barana A, Caballero R., Delpón E. New Investigational Drugs for the Management of Acute Heart Failure Syndromes. *Current Medicinal Chemistry* 2010:1–28.
38. Lincoln TM, Cornwell T L. Towards an understanding of the mechanism of action of cyclic AMP and cyclic GMP in smooth muscle relaxation. *Abstract*:129–37.
39. Fajardo AM, Piazza GA, Tinsley HN. The role of cyclic nucleotide signaling pathways in cancer: targets for prevention and treatment. *Cancers (Basel)* 2014; 6(1):436–58.
40. Willipinski-Stapelfeldt B, Lübberstedt J, Stelter S, Vogt K, Mukhopadhyay AK, Müller D. Comparative analysis between cyclic GMP and cyclic AMP signalling in human sperm. *Mol Hum Reprod* 2004; 10(7):543–52.
41. Abdallah Y, Gkatzoflia A, Pieper H, Zoga E, Walther S, Kasseckert S et al. Mechanism of cGMP-mediated protection in a cellular model of myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2005; 66(1):123–31.
42. Scheffler et al. Specific Detection of Multidrug Resistance Proteins MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, and MDR3 P-Glycoprotein with a Panel of Monoclonal Antibodies1. *Cancer Research*; 2000:5269–77.
43. Klokouzas A, Wu C-P, van Veen HW, Barrand MA, Hladky SB. cGMP and glutathione-conjugate transport in human erythrocytes. *Eur J Biochem* 2003; 270(18):3696–708.
44. Sassi Y, Ahles A, Truong D-JJ, Baqi Y, Lee S-Y, Husse B et al. Cardiac myocyte-secreted cAMP exerts paracrine action via adenosine receptor activation. *J Clin Invest* 2014; 124(12):5385–97.

45. Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D. The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 2000; 275(39):30069–74.
46. Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA, Baas F, and Borst P. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Research* 1997:3537–47.
47. Belinsky MG, Bain LJ, Balsara BB, Testa JR, Kruh GD. Characterization of MOAT-C and MOAT-D, New Members of the MRP/cMOAT Subfamily of Transporter Proteins. *Journal of the National Cancer Institute* 1998:1735–41.
48. Dazert P, Meissner K, Vogelgesang S, Heydrich B, Eckel L, Böhm M et al. Expression and Localization of the Multidrug Resistance Protein 5 (MRP5/ABCC5), a Cellular Export Pump for Cyclic Nucleotides, in Human Heart. *The American Journal of Pathology* 2003; 163(4):1567–77.
49. Shi Z, Tiwari AK, Patel AS, Fu L-W, Chen Z-S. Roles of sildenafil in enhancing drug sensitivity in cancer. *Cancer Research* 2011; 71(11):3735–8.
50. Reid G, Wielinga P, Zelcer N, de Haas M, van Deemter L, Wijnholds J, Balzarini J, Borst P. Characterization of the Transport of Nucleoside Analog Drugs by the Human Multidrug Resistance Proteins MRP4 and MRP5. *Molecular Pharmacology* 2003:1094–103.
51. Wijnholds J, Mol CA, van Deemter L, de Haas M, Scheffer GL, Baas F, Beijnen JH, Scheper RJ, Hatse S, De Clercq E, Balzarini J, Borst P. Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *PNAS* 2000:7476–81.
52. Yoshida M, Suzuki T, Komiya T, Hatashita E, Nishio K, Kazuhiko N, Fukuoka M. Induction of MRP5 and SMRP mRNA by adriamycin exposure and its overexpression in human lung cancer cells resistant to adriamycin. *Int J Cancer* 2001:432–7.
53. Pitot H, Peraino C, Morse P, Potter V. Hepatomas in tissue culture compared with adapting liver in vivo. *NCI Monograph*; 1964:13.
54. Firulli A, David Han D, et al. A Comparative Molecular Analysis of Four Rat Smooth Muscle Cell Lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*:217–26.

55. Powell T, Terrar DA, Twist VW. ELECTRICAL PROPERTIES OF INDIVIDUAL CELLS ISOLATED FROM ADULT RAT VENTRICULAR MYOCARDIUM. *J Physiol(LONDON)*; 1980(302):131–53.
56. Piper HM, Volz A, Schwartz P, Hrsg. Adult ventricular heart muscle cells, in *Tissue culture techniques in heart and vessel research*: Springer; 1992.
57. Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 2004; 22(3):326–30.
58. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*; 1985:76–85.
59. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Biotechnology*; 1979:145–9.
60. Meyer zu Schwabedissen HEU, Grube M, Heydrich B, Linnemann K, Fusch C, Kroemer HK et al. Expression, Localization, and Function of MRP5 (ABCC5), a Transporter for Cyclic Nucleotides, in Human Placenta and Cultured Human Trophoblasts. *The American Journal of Pathology* 2005; 166(1):39–48.
61. Peart JN, Gross ER, Reichelt ME, Hsu A, Headrick JP, Gross GJ. Activation of kappa-opioid receptors at reperfusion affords cardioprotection in both rat and mouse hearts. *Basic Res Cardiol* 2008; 103(5):454–63.
62. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest* 2013; 123(1):92–100.
63. Skyschally A, Schulz R, Heusch G. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *herz*; 2008:88–100.
64. Bischoff E. Potency, selectivity, and consequences of nonselectivity of PDE inhibition. *Int J Impot Res* 2004; 16 Suppl 1:S11-4.
65. Burley DS, Ferdinandy P, Baxter GF. Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischaemia-reperfusion: opportunities and obstacles for survival signaling. *British J of Pharmacology* 2007:855–69.

66. Ockaili R, Salloum F, Hawkins J, Kukreja RC. Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial K(ATP) channels in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283(3):H1263-9.
67. Ravipati G, McClung JA, Aronow WS, Peterson SJ, Frishman WH. Type 5 phosphodiesterase inhibitors in the treatment of erectile dysfunction and cardiovascular disease. *Cardiol Rev* 2007; 15(2):76–86.
68. Krieg T, Liu Y, Rütz T, Methner C, Yang X-M, Dost T et al. BAY 58-2667, a nitric oxide-independent guanylyl cyclase activator, pharmacologically post-conditions rabbit and rat hearts. *Eur Heart J* 2009; 30(13):1607–13.
69. Kuno A, Solenkova NV, Solodushko V, Dost T, Liu Y, Yang X-M et al. Infarct limitation by a protein kinase G activator at reperfusion in rabbit hearts is dependent on sensitizing the heart to A2b agonists by protein kinase C. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295(3):H1288-H1295.
70. Stasch J-P, Schmidt P, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Haerter M, Heil M, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schramm M, Schroeder W, Schroeder H, Stahl E, Steinke W, Wunder F. NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *British J of Pharmacology*; 2002:773–83.
71. Zaccolo M, Movsesian MA. cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circ Res* 2007; 100(11):1569–78.
72. Becker EM, Schmidt P, Schramm M, Schröder H, Walter U, Hoenicka M, Gerzer R, Stasch JP. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP): target of YC-1 and nitric oxide effects in human and rat platelets. *J Cardiovasc Pharmacol*:390–7.
73. Makaula S, Lochner A, Genade S, Sack MN, Awan MM, Opie LH. H-89, a Non-Specific Inhibitor of Protein Kinase A, Promotes Post-Ischemic Cardiac Contractile Recovery and Reduces Infarct Size. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005:341–7.
74. Downey JM, Krieg T, Cohen MV. Mapping preconditioning's signaling pathways: an engineering approach. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1123:187–96.
75. Das M, Parker JE, Halestrap AP. Matrix volume measurements challenge the existence of diazoxide/glibenclamide-sensitive KATP channels in rat mitochondria. *J Physiol (Lond)* 2003; 547(Pt 3):893–902.

76. Xu Z, Downey JM, Cohen MV. Timing and duration of administration are crucial for antiinfarct effect of AMP 579 infused at reperfusion in rabbit heart. *Heart Dis*:368–71.
77. Yang X-M, Proctor JB, Cui L, Krieg T, Downey JM, Cohen MV. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44(5):1103–10.
78. Lim SY, Davidson SM, Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: the essential role of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res* 2007; 75(3):530–5.
79. Frey R, Mück W, Unger S, Artmeier-Brandt U, Weimann G, Wensing G. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, tolerability, and safety of the soluble guanylate cyclase activator cinaciguat (BAY 58-2667) in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol* 2008; 48(12):1400–10.
80. Stasch J-P, Schmidt PM, Nedvetsky PI, Nedvetskaya TY, H S AK, Meurer S et al. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J Clin Invest* 2006; 116(9):2552–61.
81. Dumitrascu R, Weissmann N, Ghofrani HA, Dony E, Beuerlein K, Schmidt H et al. Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling. *circulation* 2006; 113(2):286–95.
82. Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Hasko G, Schmidt HHHW, Stasch J-P. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov.*; 2006:755–68.
83. Boerrigter G, Costello-Boerrigter LC, Cataliotti A, Lapp H, Stasch J-P, Burnett JC. Targeting heme-oxidized soluble guanylate cyclase in experimental heart failure. *Hypertension* 2007; 49(5):1128–33.
84. Erdmann E, Semigran MJ, Nieminen MS, Gheorghide M, Agrawal R, Mitrovic V et al. Cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator, unloads the heart but also causes hypotension in acute decompensated heart failure. *Eur Heart J* 2013; 34(1):57–67.
85. Belleville-Rolland T, Sassi Y, Decouture B, Dreano E, Hulot J-S, Gaussem P et al. MRP4 (ABCC4) as a potential pharmacologic target for cardiovascular disease. *Pharmacol Res* 2016; 107:381–9.

86. Abula N, Chinn LW, Nakamura T, Liu L, Huang CC, Johns SJ et al. The human multidrug resistance protein 4 (MRP4, ABCC4): functional analysis of a highly polymorphic gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 325(3):859–68.
87. Denk GU, Soroka CJ, Takeyama Y, Chen W-S, Schuetz JD, Boyer JL. Multidrug resistance-associated protein 4 is up-regulated in liver but down-regulated in kidney in obstructive cholestasis in the rat. *J Hepatol* 2004; 40(4):585–91.
88. Schuetz J, Connelly M, Sun D, Paibir S, Flynn P, Srinivas R. MRP4: a previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nat Med* 1999:1048–51.
89. Sellers ZM, Naren AP, Xiang Y, Best PM. MRP4 and CFTR in the regulation of cAMP and β -adrenergic contraction in cardiac myocytes. *Eur J Pharmacol* 2012; 681(1-3):80–7.
90. Sassi Y, Abi-Gerges A, Fauconnier J, Mougnot N, Reiken S, Haghighi Kea. Regulation of cAMP homeostasis by the efflux protein MRP4 in cardiac myocytes. *FASEB J*:1009–17.
91. Sampath J, Adachi M, Hatse S, Naesens L, Balzarini J, Flatley RM, Matherly LH, Schuetz JD. Role of MRP4 and MRP5 in biology and chemotherapy. *AAPS PharmSci*; 2002:22–30.
92. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009; 136(4):642–55.
93. Chen J, Wall NR, Kocher K, Duclos N, Fabbro D, Neuberg D et al. Stable expression of small interfering RNA sensitizes TEL-PDGFR β to inhibition with imatinib or rapamycin. *J Clin Invest* 2004; 113(12):1784–91.
94. Sharp PA. RNA interference—2001. *Genes Dev* 2001:485–90.
95. Tijsterman M, Plasterk RHA. Dicers at RISC: The Mechanism of RNAi. *Cell* 2004:1–3.
96. Hannon G. J. RNA interference. *Nature* 2002:244–51.
97. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001:188–220.
98. Kuhlmann M NW. Gen, sei still! RNA-Interferenz. *Biol. Unserer Zeit* 2004:142–50.
99. Cheepala SB, Pitre A, Fukuda Y, Takenaka K, Zhang Y, Wang Y et al. The ABCC4 membrane transporter modulates platelet aggregation. *Blood* 2015; 126(20):2307–19.

7 Anhang

7.1 Zusammenfassung der erhobenen Daten

Tab. 7.1: Infarktgrößedaten der isolierten, perfundierten Rattenherzen mit BAY 58-2667.

	Risikoareal (cm ³)	Infarktareal (cm ³)	Infarktgröße (% Risikoareal)	Signifikanz (vs. Kontrolle)
Kontrolle	0.130 ± 0.011	0.038 ± 0.019	29.2 ± 1.6	
BAY 58-2667 1 nM	0.139 ± 0.008	0.042 ± 0.019	26.4 ± 3.7	p>0.999
BAY 58-2667 50 nM	0.145 ± 0.018	0.019 ± 0.006	16.4 ± 5.3	* p<0.001
BAY 58-2667 1 µM	0.141 ± 0.012	0.029 ± 0.019	19.9 ± 6.4	* p<0.001

Legende: BAY 58, BAY 58-2667; Werte angegeben in MW±SEM.

Tab. 7.2: Infarktgrößedaten der isolierten, perfundierten Rattenherzen.

	Risikoareal (cm ³)	Infarktareal (cm ³)	Infarktgröße (% Risikoareal)	Signifikanz (vs. Kontrolle)
Kontrolle	0.130 ± 0.011	0.038 ± 0.019	29.2 ± 1.6	
BAY 58-2667 50 nM	0.145 ± 0.018	0.019 ± 0.006	16.4 ± 5.3	* p<0.001
BAY 58-2667 50 nM + L-NAME 200 µM	0.114 ± 0.014	0.018 ± 0.004	15.4 ± 2.8	* p<0.005
BAY 58-2667 50 nM + KT-5823 1 µM	0.144 ± 0.013	0.043 ± 0.019	29.8 ± 1.7	p>0.05
BAY 58-2667 50 nM + 5 HD 100 µM	0.151 ± 0.018	0.045 ± 0.006	30.3 ± 2.3	p>0.05
L-NAME 200 µM	0.122 ± 0.006	0.037 ± 0.005	30.2 ± 3.5	p>0.05

Legende: BAY 58, BAY 58-2667; L-NAME, N^o-Nitro-L-Arginin-Methylesterhydrochlorid; 5-HD, 5-Hydroxydekanat; KT-5823; Werte angegeben in MW±SEM.

Tab. 7.3: Koronarfluss isolierter, perfundierter Rattenherzen.

	Nullwert (ml/min)	Okklusion (ml/min)	Reperfusion (ml/min)
Kontrolle	16,4±0,6	10,7±0,5	15,6±0,6
BAY (1 nM/l)	13,3±0,3	9,3±0,5	12,7±2,2
BAY (50 nM/l)	19,8±1,2	15,0±0,9	17,0±1,3
BAY (1.000 nM/l)	18,0±1,2	11,3±0,9	18,4±0,5
BAY + L-NAME	12,8±0,8	9,2±1,3	13,0±1,6
BAY + 5-HD	12,9±0,9	7,4±0,7	16,1±0,5
BAY + KT-5823	12,9±0,9	7,5±0,9	10,0±0,5
L-NAME	13,1±0,7	7,6±0,4	8,9±1,0

Legende: BAY, BAY 58-2667; L-NAME, N^o-Nitro-L-Arginin-Methylesterhydrochlorid; 5-HD, 5-Hydroxydekanat; KT-5823. Die Daten der Nullwerte, Okklusion und Reperfusion wurden 5 min nach der Stabilisierung, am Ende der 30 min Ischämie, und 5 min nach Beginn der Reperfusion gemessen. Werte angegeben in MW ± SEM.

7.2 Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines Elektrokardiogramms.	-2-
Abb. 1.2: Zelluläre Vorgänge während der Ischämie.	-4-
Abb. 1.3: Beitrag zur Sterblichkeit der Myokardzellen, aufgegliedert nach Schaden durch die Ischämie, Reperfusion bzw. der erzielbare Effekt der Myokardprotektion.	-6-
Abb. 1.4: Zelluläre Vorgänge während der Reperfusion.	-6-
Abb. 1.5: Ischämische Präkonditionierung.	-10-
Abb. 1.6: Schematische Darstellung des Signalweges der Präkonditionierung.	-11-
Abb. 1.7: Ischämische Postkonditionierung.	-13-
Abb. 1.8: Pharmakologische Prä- und Postkonditionierung.	-14-
Abb. 1.9: Schematische Darstellung der NO-unabhängigen Wirkungsweise von sGC Aktivatoren und Stimulatoren.	-16-
Abb. 1.10: Struktur von BAY 58-2667.	-17-
Abb. 1.11: Schematische Darstellung des Aufbaus der Multidrug Resistance Proteine 4 und 5 [MRP 4/5/ ABCC 4/5].	-18-
Abb. 1.12: Schematische Darstellung der Rolle von ABCC 4 und ABCC 5 in der intrazellulären cGMP-Regulation.	-19-
Abb. 2.1: Darstellung des Ursprungsvektors pQCXIH.	-34-
Abb. 2.2: Darstellung der verwendeten Vektoren V4 und V5.	-34-
Abb. 2.3: Rattenherz an der Langendorff-Apparatur.	-36-
Abb. 2.4: Schematische Darstellung des Versuchsablauf eines <i>ex vivo</i> perfundierten Rattenherzexperimentes.	-37-
Abb. 2.5: Substanzapplikation im <i>ex vivo</i> perfundierten Rattenherzexperiment.	-37-
Abb. 2.6: Infarktgrößenbestimmung.	-39-
Abb. 2.7: Ablauf der Behandlung der Zellen mit Plasmid-DNA in Kombination mit FuGENE 6; anschließende molekularbiologische Analysen und funktionelle Versuche.	-45-

Abb. 2.8:	Schematische Darstellung der Sondendegradierung während eines TaqMan-Laufes.	-48-
Abb. 2.9:	Chemische Struktur einer TaqMan®PCR-Sonde.	-50-
Abb. 2.10:	Amplifikationsdiagramm.	-51-
Abb. 2.11:	Virusproduktion in Verpackungszelllinien.	-60-
Abb. 2.12:	Schematischer Aufbau eines Nassblottes.	-67-
Abb. 3.1:	Kardioprotektiver Effekt von BAY 58-2667 in isolierten Rattenherzen.	-74-
Abb. 3.2:	Eingriffspunkt des eNOS-Inhibitors L-NAME in den postulierten Signalweg.	-75-
Abb. 3.3:	Effekt des eNOS Inhibitor L-NAME auf die kardioprotektive Wirkung von BAY 58-2667.	-76-
Abb. 3.4:	Eingriffspunkt des PKG-Inhibitors KT-5823 in den postulierten Signalweg.	-76-
Abb. 3.5:	Effekt der Inhibition von PKG auf die kardioprotektive Wirkung von BAY 58-2667.	-77-
Abb. 3.6:	Eingriffspunkt des Inhibitors des mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanals (mK_{ATP}) 5-HD in den postulierten Signalweg.	-77-
Abb. 3.7:	Effekt der Inhibition des mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanals (mK_{ATP}) auf die kardioprotektive Wirkung von BAY 58-2667.	-78-
Abb. 3.8:	Effekt von BAY 58-2667 auf den Koronarfluss in isolierten Rattenherzen.	-79-
Abb. 3.9:	Effekt von BAY 58-2667+L-NAME auf den Koronarfluss in isolierten Rattenherzen.	-80-
Abb. 3.10:	Effekt von BAY 58-2667+KT-5823 auf den Koronarfluss in isolierten Rattenherzen.	-81-
Abb. 3.11:	Effekt von BAY 58-2667+5-HD auf den Koronarfluss in isolierten Rattenherzen.	-81-
Abb. 3.12:	Effekt von BAY 58-2667 auf den cAMP und cGMP Spiegel in isolierten Rattenherzen.	-82-
Abb. 3.13:	Repräsentativer Western Blot der ABCC 4-Expression in der Membranfraktion.	-84-
Abb. 3.14:	Repräsentativer Western Blot der ABCC 4-Expression in der Zytosolfraktion.	-84-
Abb. 3.15:	Mikroskopische Aufnahmen zum Nachweis der ABCC 5-Lokalisation in HL-1 Zellen.	-85-
Abb. 3.16:	Mikroskopische Aufnahmen zum Nachweis der ABCC 5-Lokalisation in A7r5 Zellen.	-85-
Abb. 3.17:	Mikroskopische Aufnahmen zum Nachweis der ABCC 5-Lokalisation in isolierten adulten Rattenkardiomyozyten (ARK).	-86-
Abb. 3.18:	Mikroskopische Aufnahmen von HL-1 Zellen zum Nachweis der Transfektion mittels FuGENE.	-86-
Abb. 3.19:	Quantifizierung der ABCC 4/5-mRNA mittels Real Time-RT-PCR (TaqMan®).	-87-
Abb. 3.20:	Darstellung einer gelelektrophoretischen Auftrennung der Ligationsprodukte zur Auswahl der geeigneten Bakterienklone.	-88-
Abb. 3.21:	Darstellung der auf Deckgläschen gewachsenen, mit V5 enthaltenden Viren infizierten A7r5 Zellen.	-89-

Abb. 3.22:	Darstellung der ABCC 4-mRNA-Expression in den transfizierten A7r5 Zellen ermittelt durch quantitative RT-PCR nach dem TaqMan®-Prinzip.	-90-
Abb. 3.23:	Darstellung der ABCC 5-mRNA-Expression in den transfizierten A7r5 Zellen ermittelt durch quantitative RT-PCR nach dem TaqMan®-Prinzip.	-91-
Abb. 3.24:	Darstellung der auf Deckgläschen gewachsenen, mit V5 enthaltenden Viren infizierten H4IIE Zellen.	-92-
Abb. 3.25:	Darstellung der ABCC 4-mRNA-Expression in den transfizierten H4IIE Zellen ermittelt durch quantitative RT-PCR nach dem TaqMan®-Prinzip.	-93-
Abb. 3.26:	Darstellung der ABCC 5-mRNA-Expression in den transfizierten H4IIE Zellen ermittelt durch quantitative RT-PCR nach dem TaqMan®-Prinzip.	-93-
Abb. 3.27:	Repräsentativer Western Blot der ABCC 4 und 5- Proteinexpression in siRNA transfizierten H4IIE Zellen.	-94-
Abb. 3.28:	Zytotoxische Wirkung von Thioguanin und Mercaptopurin auf unbehandelten H4IIE Zellen.	-95-
Abb. 3.29:	: Zytotoxische Wirkung von Thioguanin nach viraler Transfektion und knock down von ABCC 4 und ABCC 5.	-96-
Abb. 3.30:	Zytotoxische Wirkung von Mercaptopurn nach viraler Transfektion und knockdown von von ABCC 4 und ABCC 5.	-96-

7.3 Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 2.1:	Gruppeneinteilung für das ex vivo perfundierte Rattenherzexperiment -38-
Tab. 2.2:	Ein-Schritt-Protokoll der Gold RT-TaqMan®PCR. -49-
Tab. 2.3:	Reaktionsansatz für eine Probe. -49-
Tab. 2.4:	Primerdesign. -50-
Tab. 2.5:	Sondendesign. -50-
Tab. 2.6:	Protokoll für Annealing der siRNA. -53-
Tab. 2.7:	Reaktionsansatz für eine Probe. -54-
Tab. 2.8:	PCR-Ansatz zur Klonierung. -55-
Tab. 2.9:	Protokoll für Klon-PCR. -56-
Tab. 2.10:	Protokoll für Klon-PCR. -58-
Tab. 2.11:	Protokoll zur Sequenzierung der siRNA enthaltenden Vektoren. -58-
Tab. 2.12:	Reaktionsansatz zur Virusproduktion. -60-
Tab. 2.13:	Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel -65-
Tab. 7.1:	Infarktgrößedaten der isolierten, perfundierten Rattenherzen mit BAY 58-2667. -114-
Tab. 7.2:	Infarktgrößedaten der isolierten, perfundierten Rattenherzen. -114-
Tab. 7.3:	Koronarfluss isolierter, perfundierter Rattenherzen. -114-

7.4 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen sind, habe ich in jedem Falle durch Angaben der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht.

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

Rostock, 2020

.....

(Thomas Rütz)

7.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich außerordentlich bei Frau Dr. Carmen Methner für das entgegengebrachte Vertrauen, die Motivation und stetige „transatlantische“ Hilfestellung bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

PD Dr. med. Thomas Krieg , Frau Dr. rer. nat. Karina Förster, PD Dr. rer. nat. Markus Grube und PD Dr. rer. nat. habil. Ulrich Hoffmann (+) danke ich für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Kristin Wenzel, Frau Dr. Barbara Gubalke, Herrn Georg Meyer-Rienecker und Familie Dr. Rüdiger Meyer die mich während der Bearbeitung meiner Dissertation unterstützt haben.

Meinen Arbeitskollegen, Ulrike Donat, Katrin Zimmermann und Ole Maas gilt ein großer Dank für die produktive, tolle Zusammenarbeit und gegenseitige Motivation.

Ermöglicht haben diese Arbeit Prof. Ince und Prof. Felix, die die zusätzlichen Semester getragen haben. Vielen Dank.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Frau Tina, meinen Söhnen Henning V., Fiete T. und meiner Familie bedanken, die mir oft bewusst und unbewusst an vielen Stellen geholfen haben.

Wissenschaftliche Arbeiten

Originalpublikationen:

Maas O, Donat U, Frenzel M, **Rütz T**, Kroemer HK, Felix SB, Krieg T. Vardenafil protects isolated rat hearts at reperfusion dependent on GC and PKG. Br J Pharmacol 2008;154:25-31

Krieg T, Liu Y, **Rütz T**, Methner C, Yang X-M, Dost T, Felix SB, Stasch J-P, Cohen MV, Downey JM (2009) BAY 58-2667, a nitric oxide-independent guanylyl cyclase activator, pharmacologically post-conditions rabbit and rat hearts. Eur Heart J. 30(13): 1607-1613.

Abstracts:

Krieg T, Liu Y, **Rütz T**, Methner C, Yang XM, Felix SB, Downey JM (2009) BAY 58- 2667, an NO-independent guanylyl cyclase activator, pharmacologically post-conditions rabbit and rat hearts. BMC Pharmacology, 9(Suppl 1): P36.

Methner C, **Rütz T**, Felix SB, Krieg T (2009) Cardioprotective effect of NO-independent guanylyl cyclase activator BAY 58-2667 at reperfusion in rat and mouse heart. Summer school ISHR, Nizza, Frankreich.