

**Protektive Wirkungen von Trapidil bei Myokardischämie**  
**Vergleichende Untersuchungen an Wildtyp- und**  
**Phospholamban-defizienten Mäusen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Gernot Kaber  
aus Krefeld

Düsseldorf 2008

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. K. Schrör  
Koreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. H.-D. Höltje

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Januar 2008

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>8</b>
2.1	<b>Substanzen</b> .....	<b>8</b>
2.2	<b>Puffer und Lösungen</b> .....	<b>8</b>
2.3	<b>Antikörper</b> .....	<b>12</b>
2.4	<b>Geräte und Materialien</b> .....	<b>13</b>
2.5	<b>Das Langendorff-Modell der Maus</b> .....	<b>15</b>
2.5.1	Tiere und Futter.....	15
2.5.2	Die Langendorff-Apparatur.....	16
2.5.3	Präparation der Mäuseherzen.....	16
2.5.4	Das Ischämie-/Reperfusion-Protokoll .....	18
2.6	<b>Funktionelle Messungen</b> .....	<b>19</b>
2.7	<b>Biochemische Messungen</b> .....	<b>21</b>
2.7.1	Bestimmung der Kreatinkinase in den Perfusaten .....	21
2.7.2	Bestimmung der Ca <sup>2+</sup> -Aufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum ..	21
2.8	<b>Western-Blot</b> .....	<b>24</b>
2.8.1	Proteingewinnung aus Herzgewebe nach Ende der Perfusion .....	24
2.8.2	Proteinbestimmung aus RIPA-Puffer .....	24
2.8.3	Auftrennung der Proteine .....	25
2.8.4	Detektion spezifischer Proteine.....	25
2.8.5	Proteinbeladung der Membran und densitometrische Auswertung .....	26
2.9	<b>Einfluss von Trapidil auf die Proteinexpression</b> .....	<b>27</b>
2.9.1	Proteingewinnung für die 2D-Elektrophorese.....	28
2.9.2	Proteinbestimmung aus Lysepuffer für die 2D-Elektrophorese .....	28
2.9.3	Isoelektrische Fokussierung.....	29
2.9.4	Äquilibrierung der IPG-Streifen vor der zweiten Dimension .....	30
2.9.5	Auftrennung in der zweiten Dimension.....	30
2.9.6	Coomassie-Färbung der 2D-Gele .....	31
2.9.7	Massenspektrometrie.....	31
2.10	<b>Quantitative RT-PCR (qPCR)</b> .....	<b>32</b>
2.10.1	RNA Präparation für die qPCR.....	32
2.10.2	Durchführung der qPCR.....	33
2.11	<b>Statistik</b> .....	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>34</b>
3.1	<b>Eigenwirkung von Trapidil in nicht-ischämischen Herzen</b> .....	<b>34</b>
3.2	<b>Ischämieprotokoll in WT- und PLN<sup>-/-</sup>-Mäusen</b> .....	<b>36</b>
3.3	<b>Einfluss von Trapidil auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden in WT-Mäusen</b> .....	<b>37</b>
3.3.1	Funktionelle Parameter .....	37

3.3.2	Biochemische Parameter .....	42
3.3.3	Tyrosinphosphorylierung .....	44
3.3.4	Phosphorylierung von PKA-Substraten .....	45
3.3.5	Phospholamban-Phosphorylierung am Serin 16 nach Ischämie/Reperfusion .....	47
3.3.6	Zusammenfassung 3.3.....	48
<b>3.4</b>	<b>Einfluss von Trapidil auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden in PLN<sup>-/-</sup>-Mäusen .....</b>	<b>49</b>
3.4.1	Funktionelle Parameter .....	49
3.4.2	Biochemische Parameter .....	54
3.4.3	Zusammenfassung 3.4.....	56
<b>3.5</b>	<b>Einfluss von Trapidil auf die Expression von ECH1 .....</b>	<b>57</b>
3.5.1	Expression von ECH1 auf Proteinebene .....	57
3.5.2	Expression von ECH1 auf Genebene .....	60
3.5.3	Zusammenfassung 3.5.....	61
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>62</b>
4.1	Substrate der Trapidil-induzierten PKA-Aktivierung - Phospholamban .....	66
4.2	Weitere Veränderungen in der Proteinexpression - ECH1 .....	71
4.3	Trapidil und Ca <sup>2+</sup> -Homöostase.....	72
4.4	Ausblick .....	75
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>78</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>87</b>
8.1	Fachzeitschriften.....	87
8.2	Kongressbeiträge.....	88
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>89</b>
<b>10</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>91</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>92</b>

---

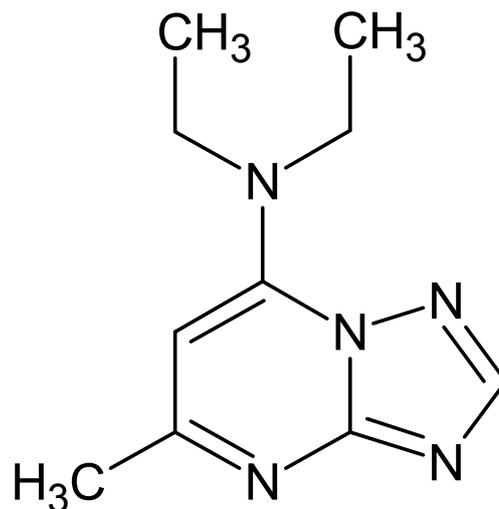
## Abkürzungsverzeichnis

+dp/dt	Maximale Kontraktionsgeschwindigkeit
-dp/dt	Maximale Relaxationsgeschwindigkeit
AKAP	A-Kinase Ankerprotein
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
Ci	Curie
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CK	Kreatinkinase
COX-2	Cyclooxygenase-2
cpm	Radioaktive Ereignisse pro Minute
DIGE	Differentielle Gelelektrophorese
DTT	Dithiothreitol
ECH1	Enoyl Coenzym-A Hydratase 1
ECL	enhanced chemiluminescence
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IMAC	Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
I/R	Ischämie/Reperfusion
kDa	Kilodalton
KO	Knock out
$\Delta$ LVP	Linksventrikulär aktiv entwickelter Druck
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Protein Kinase
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NFKB	Nukleärer Faktor KB
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor
PDE	Phosphodiesterase

PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub>
PKA	Proteinkinase-A
PLN	Phospholamban
PLN <sup>-/-</sup>	Homozygot phospholamban-defiziente Maus
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Raf	rapidly growing fibrosarcoma
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Ser	Serin
SERCA2	Sarkoplasmatische/Endoplasmatische Reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase 2
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Thr	Threonin
TPD	Trapidil
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

Im Jahre 1971 beschrieben Tenor und Ludwig von den Deutschen Hydrierwerken in Rodleben (DDR) erstmals die Synthese neuer s-Triazolo [1,5- $\alpha$ ] Pyrimidine, darunter das 5-Methyl-7-diäthylamino-Analog (Abbildung 1-1). Diese Substanz wurde zunächst als nitratähnlicher Vasodilatator mit einer gewissen Präferenz für Koronargefäße angesehen und erhielt später den generischen Namen Trepidil (Füller *et al.*, 1971). Eine protektive Wirkung bei Myokardischämie wurde in verschiedenen klinischen Studien gezeigt (Yasue *et al.*, 1999, Maresta *et al.*, 2005, Meinertz und Lehmacher 2006). Trepidil (Rocornal<sup>®</sup>) wurde zur Behandlung der ischämischen Herzkrankheit eingeführt und ist auch heute noch für diese Indikation zugelassen, obwohl die diesem Effekt zugrunde liegenden pharmakologischen Mechanismen in wesentlichen Punkten ungeklärt und zum Teil widersprüchlich sind.



**Abbildung 1-1** Strukturformel von 5-Methyl-7-diäthylamino-s-triazolo-(1,5-a) pyrimidin (Trepidil, Rocornal<sup>®</sup>)

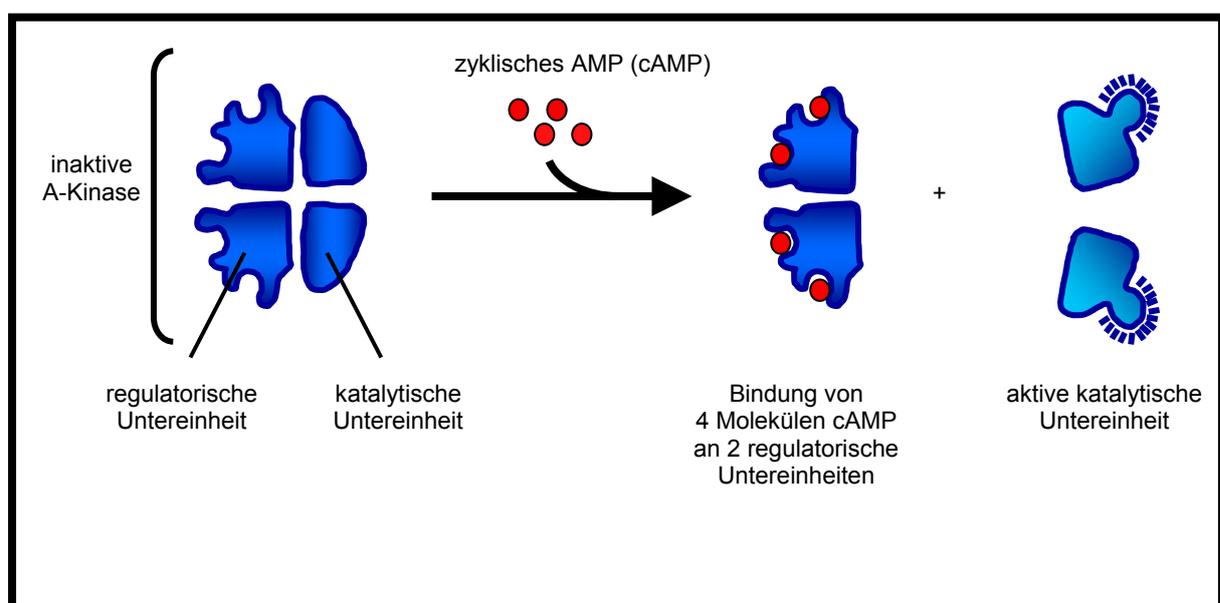
Experimentelle *in vivo* Untersuchungen an gesunden Versuchstieren haben nur geringe oder keine direkten kardialen Wirkungen im Sinne von positiv inotropen oder chronotropen Effekten für Trepidil (TPD) gezeigt (Füller *et al.*, 1971). *In vitro* wurden positiv inotrope oder chronotrope Effekte der Substanz gefunden, aber erst in Konzentrationen von  $\geq 250 \mu\text{M}$ . Diese Konzentrationen sind um das 30 – 100-fache höher als die maximal therapeutisch erreichbaren Plasmaspiegel der Substanz nach

üblicher oraler Gabe von 200 mg (ca. 3 mg/kg) *tid*: etwa 10 – 20  $\mu$ M beim Menschen (Harder *et al.*, 1996). Sie spielen daher therapeutisch keine Rolle. Auch kommt es unter klinischen Bedingungen allenfalls nach intravenöser Gabe nicht aber nach oraler Verabreichung zu (passageren) inotropen, chronotropen und hypotensiven Effekten. Direkte kardiale Wirkungen von Trapidil auf das nicht-ischämische Myokard sind daher nicht anzunehmen. Dies wird auch durch die vorhandenen toxikologischen Daten bei Trapidilüberdosierung bestätigt.

Anders verhält es sich beim ischämischen Myokard. Am Hund führten 3 mg/kg Trapidil als konstante intravenöse Infusion über 60 Minuten, beginnend 60 Minuten nach Erzeugung einer Myokardischämie (Anlegen einer Koronarligatur), zu einer Reduktion der Infarktgröße um 69 % sowie einer signifikanten Hemmung des Kreatin-Kinase (CK)-Anstiegs und der Ischämie-assoziierten ST-Streckenänderungen im EKG (Yamaguchi *et al.*, 1983). Besonders bemerkenswert im Zusammenhang mit diesen antiischämischen Wirkungen ist, dass Trapidil-Vorbehandlung auch den ischämieinduzierten Abfall des myokardialen Gehalts von ATP und Kreatinphosphat signifikant reduzierte (Yamaguchi *et al.*, 1983), d. h. zu einer Verbesserung der Energiebilanz des ischämischen Herzens führte, die offenbar mit der besonderen metabolischen Situation unter diesen Bedingungen zusammenhing und insofern spezifisch für das ischämische Myokard war.

Die Selektivität der Wirkung für das ischämische Myokard machte die Substanz pharmakologisch attraktiv und führte zur gezielten Suche nach zellulären Wirkungsmechanismen. Unsere Arbeitsgruppe konnte an vaskulären Glattmuskelzellen und später auch am Herzen erstmals eine (direkte) Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) im Zusammenhang mit antiproliferativen und antiischämischen Effekten von Trapidil nachweisen (Bönisch *et al.*, 1998, Schrör *et al.*, 1998a). Bei der Suche nach distalen Zielstrukturen wurde eine PKA-abhängige Phosphorylierung (Inaktivierung) zentraler Signalmoleküle gefunden, wie z. B. der Raf-1-Kinase (Bönisch *et al.*, 1998) und NFK<sub>B</sub> (Schrör *et al.*, 1998b). Beide Moleküle sind integrale Bestandteile von Signalketten, die Zellproliferations- bzw. Apoptosesignale vermitteln. Für das ischämische Myokard war der Befund einer PKA-Aktivierung im Zusammenhang mit kardioprotektiven Effekten unerwartet und überraschend. Ein Anstieg des zellulären (zytosolischen) cAMP-Spiegels, wie er sich

bei Myokardischämie durch einen Katecholaminoverflow aus adrenergen Nervenendigungen findet (Hirche *et al.*, 1980) und durch Prostaglandine auch am isolierten Herzen gehemmt werden kann (Schrör *et al.*, 1981), wird generell als negativ für das Ischämiegeschehen angesehen. Erhöhung des zytosolischen cAMP-Spiegels und - damit einhergehend - eine Aktivierung der (zytosolischen) PKA (Abbildung 1-2) würden eine Stoffwechselsteigerung erwarten lassen, die bei Ischämie, d.h. reduzierter Sauerstoff- und Substratzufuhr, deletär ist. In einer zur Klärung dieses Befundes am ischämischen Kaninchenherz durchgeführten Studie konnte bei Verwendung rekombinanter regulatorischer und katalytischer PKA-Einheiten gezeigt werden, dass Trapidil ein selektiver PKA-Aktivator ist und vorzugsweise eine membrangebundene, partikuläre Isoform der PKA, wahrscheinlich die Isoform  $\beta$  der PKAII nach Bindung an der regulatorischen Untereinheit aktiviert (Sichelschmidt *et al.*, 2003). Als ein Substrat der Trapidil-induzierten PKA-Aktivierung wurde Phospholamban (PLN) identifiziert und damit ein Zusammenhang mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase vermutet (Abbildung 1-3). Dies würde auch eine ischämiespezifische Wirkung erklären, da eine reduzierte Phosphorylierung von Phospholamban eine typische Begleiterscheinung der Myokardischämie und möglicherweise auch der Störung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase ist (Schoutsen *et al.*, 1989).

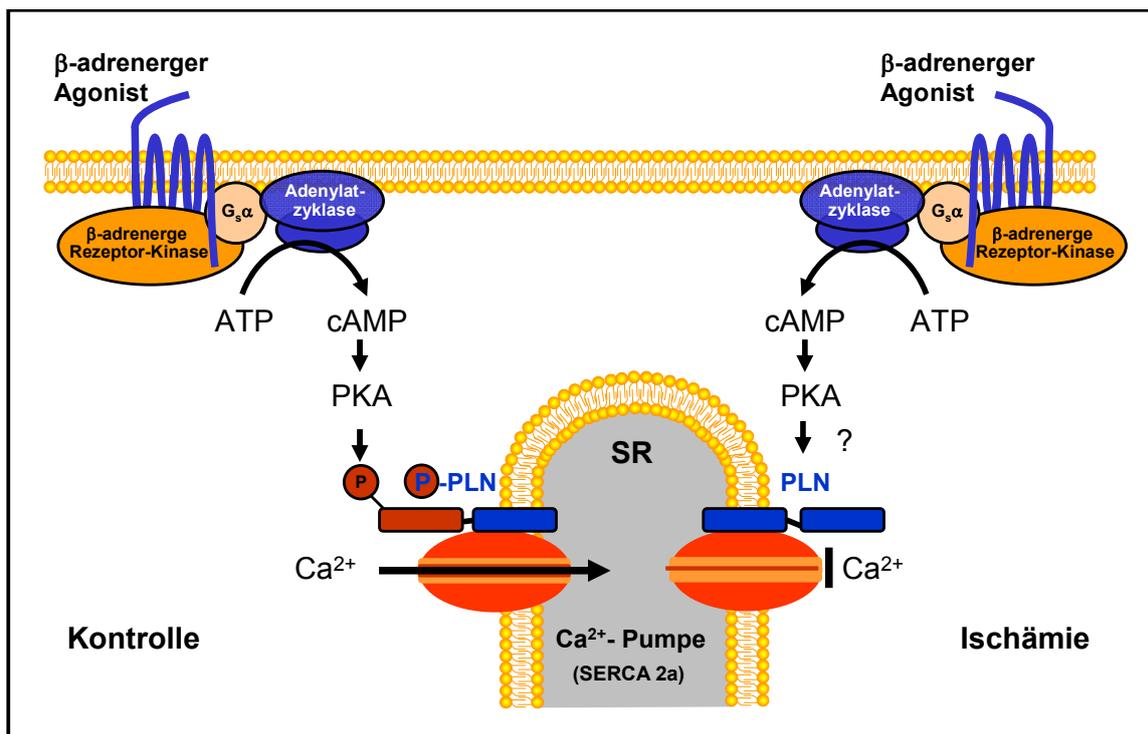


(modifiziert nach Jaenicke, Molekularbiologie der Zelle, VCH Verlag, Weinheim, p 847; 1990)

### Abbildung 1-2 Schematische Darstellung der Aktivierung der PKA durch cAMP

Die inaktive A-Kinase, bestehend aus je zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten, wird durch die Bindung von cAMP aktiviert. Durch die Bindung von vier cAMP-Molekülen an die beiden regulatorischen Untereinheiten werden die katalytischen Untereinheiten freigesetzt und aktiviert.

Bei der Bewertung dieser Befunde ist allerdings zu berücksichtigen, dass sie rein deskriptiv sind und ein kausaler Zusammenhang zwischen Phosphorylierung eines zellulären Zielproteins und Trapidil-assoziiierter PKA-Aktivierung bisher nie nachgewiesen wurde. In diesem Zusammenhang ist auch auf zahlreiche weitere dem Trapidil zugeschriebene Effekte hinzuweisen, deren therapeutische Relevanz einer kritischen Überprüfung in adäquaten experimentellen Ansätzen nicht standgehalten hat – sofern therapierelevante Dosen von  $\leq 10 \mu\text{M}$  (Harder *et al.*, 1996) verwendet wurden. Hierzu gehört die Stimulation der  $\text{PGI}_2$ -Synthese (Nieder *et al.*, 1995), Hemmung der Thromboxanbildung und –wirkung, Hemmung der Thrombozytenaggregation (Block *et al.*, 1983), gefäßdilatorische Effekte (Füller *et al.*, 1971), Wirkungen auf Ionenkanäle, Blockade von PDGF-Rezeptoren (Ohnishi *et al.*, 1981) u. a. in verschiedenen *in vitro* Systemen. Leider wurden Untersuchungen dieser Art mit nach oben praktisch unbegrenzter Dosierung (Konzentration) des Trapidils durch die extrem gute Löslichkeit der Substanz in wässrigen und lipophilen Medien verbunden mit einer minimalen Toxizität sehr erleichtert.



**Abbildung 1-3 Regulation der Kontraktilität von Kardiomyozyten über eine cAMP-abhängige PKA-induzierte Phosphorylierung von Phospholamban.**

Phospholamban wird cAMP-abhängig über Aktivierung einer Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert, an diesem Modell durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation. Durch die Phosphorylierung dissoziiert PLN von der SERCA2 ( $\text{Ca}^{2+}$ - Pumpe) ab. Die inhibitorische Wirkung von PLN auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in das SR wird aufgehoben. Durch drastische Reduktion der PLN-Phosphorylierung ist dieser Prozess am ischämischen Myokard gestört mit der Folge einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung des Zytosols. Modifiziert nach Hunter und Chien, NEJM 1999 341:1276-1283.

Besondere Aufmerksamkeit als möglicher subzellulärer Wirkungsmechanismus von Trepidil hat die Hemmung von Phosphodiesterasen (PDE) gefunden. Ein solcher Befund wurde schon in frühen Untersuchungen der Substanz erhoben (Lampe *et al.*, 1975, Krause und Karczewski 1976) und als Erklärung von vasodilatierenden und inotropen Effekten von Trepidil angesehen. In einer systematischen Untersuchung der Trepidilwirkung auf die PDE-Isoformen I-IV am isolierten Meerschweinchenherzen wurde eine unselektive Hemmung dieser PDEs gefunden (Bethke *et al.*, 1991). Dabei ließ sich für Trepidil in Konzentrationen ab etwa 100  $\mu\text{M}$  auch ein cAMP-Anstieg in vaskulären und kardiomyozytären Zellen nachweisen, der wahrscheinlich auf dieser PDE-Hemmung beruht. Ein solcher Effekt wäre, wie oben ausgeführt, potentiell ischämiefördernd und ist bei einer kardioprotektiven Substanz nicht erwünscht. Eine cAMP-Erhöhung im Herzmuskel ist allerdings klinisch aufgrund der dafür benötigten hohen Trepidil-Konzentration unwahrscheinlich. Andererseits ist ein cAMP-Anstieg die Voraussetzung für eine PKA-Aktivierung. Damit stellt sich die Frage nach der Spezifität einer Trepidilwirkung, z. B. durch Kompartimentierung oder unterschiedliche Lokalisation bzw. funktionelle Kopplungen von PKA (Isoformen) an zelluläre Zielproteine. Da sich die partikuläre PKAII vorwiegend im sarkoplasmatischen Retikulum (SR) befindet, ist denkbar, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sequestrierung aus dem Zytosol in das SR durch Trepidil gefördert wird, z. B. über eine PKA-abhängige Phosphorylierung von Phospholamban. In der Tat konnten frühere Untersuchungen am ischämisch-reperfundierten Kaninchenherz Hinweise darauf erbringen, dass Trepidil die ischämiebedingte Hemmung der Phospholambanphosphorylierung aufhebt (Sichelschmidt *et al.*, 2003), so dass Phospholamban eine mögliche Zielstruktur von Trepidil darstellt. Allerdings lässt sich aus diesem eher deskriptiven Befund keine Kausalität ableiten. Dies gilt auch für die bereits erwähnte Phosphorylierung der Raf-Kinase sowie die Aktivierung von NFK $\beta$ . (Bönisch *et al.*, 1998, Osinski und Schrör 1999).

Damit gibt es bis heute keine molekulare Erklärung für die kardioprotektive Wirkung von Trepidil. Sollte die von uns früher postulierte Wirkung eines cAMP-„sensitizing“ Effektes für die PKA-Aktivierung zutreffen (Sichelschmidt *et al.*, 2003), könnte Trepidil der erste Vertreter dieser neuen Klasse kardioprotektiver bzw. antianginöser Substanzen sein. Weitere Zielproteine der Phosphorylierung sind dabei wahrscheinlich. Eine genetisch „saubere“ Antwort lässt sich allerdings nur nach

gezielter Genmanipulation erwarten, z. B. bei Verwendung entsprechend gendefizienter Tiere. Unter der Arbeitshypothese, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sequestrierung in das Zytosol einen Schlüsselvorgang der Ischämieprotektion darstellt, bieten sich die zwischenzeitlich für diese Fragestellung verfügbaren Phospholamban-KO-Mäuse (Luo *et al.*, 1994) als Versuchsmodelle an, um Veränderungen im Zusammenhang mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kinetik des sarkoplasmatischen Retikulums gezielt zu untersuchen.

Pharmakologisch interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass Trepidil mit keiner der heute bekannten Klassen antianginöser Pharmaka interferieren würde: Trepidil beeinflusst in therapeutischen Dosen – im Gegensatz zu früheren Behauptungen – weder die Blutgerinnung noch den Gefäßtonus und sollte daher weder mit Antiplättchensubstanzen, Antithrombotika oder organischen Nitraten interagieren. Auch weist die Substanz eine bemerkenswert geringe Toxizität auf, wobei ein Blutdruckabfall (PDE-Hemmung) nicht zu den akuten Intoxikationszeichen gehört. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass eine Hemmung cAMP-abbauender Phosphodiesterasen klinisch keine Rolle spielt und im Übrigen therapeutisch bei der Myokardischämie wahrscheinlich kontraindiziert wäre.

Die kardioprotektive Wirksamkeit von Trepidil in der Spezies Maus ist bisher nur unzureichend belegt. Ein solcher Effekt war jedoch Voraussetzung für weitergehende Untersuchungen zum Mechanismus der Ischämieprotektion. Hier bietet die Maus durch Verfügbarkeit transgener Tierstämme, die besondere Möglichkeit kardioprotektive Mechanismen und Wirkungen von Trepidil an selektiv genveränderten Tieren zu untersuchen. Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen homozygot Phospholamban-defiziente ( $\text{PLN}^{-/-}$ ) Mäuse. Im Falle einer Vermittlung des kardioprotektiven Effekts von Trepidil über eine verbesserte PLN-Phosphorylierung sollte in den  $\text{PLN}^{-/-}$ -Tieren keine kardioprotektive Wirkung nachweisbar sein.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

Lässt sich die am Ischämie-Reperfusionmodell des Kaninchens gezeigte antiischämische und kardioprotektive Wirkung von Trapidil auch an einem vergleichbaren Mausmodell zeigen? Sind diese Veränderungen mit einer Beeinflussung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase assoziiert?

Sind kardioprotektive Trapidileffekte auch in Phospholamban-gendefizienten Tieren nachweisbar, d.h. besteht ein kausaler Zusammenhang zwischen Ischämie-Reperfusionsschaden und Störung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase, der durch Trapidil spezifisch beeinflusst wird und eine Beteiligung der PKA erfordert?

Gibt es Veränderungen im Proteom/Phosphoproteom durch Trapidil und besteht hier ein Zusammenhang mit der PKA-spezifischen Proteinphosphorylierung?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Substanzen

*Tabelle 2-1 Verwendete Substanzen und Komplettpakete*

Substanzen	Hersteller
Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung 40 %	Bio-Rad, München
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad, München
Carbogen (5 % CO <sub>2</sub> , 95 % Sauerstoff)	Linde, Pullach
DC Protein Assay #500-0112	Bio-Rad, München
ECL plus Detection Reagent	GE-Healthcare Europe, München
Jodacetamid	Sigma-Aldrich, München
Kreatin-Kinase, Laktat-Dehydrogenase Kit	Cypress Diagnostics, Belgien
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
QuantiTect Primer Assay (200)	Qiagen, Hilden
Superscript™III First-Strand synthesis – Systems	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR Green® PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
Trapidil	UCB, Brüssel, Belgien
TriReagent®	Sigma-Aldrich, München
<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup>	Hartmann Analytics, Braunschweig

### 2.2 Puffer und Lösungen

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in höchster verfügbarer Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

**Tabelle 2-2** Verwendete Puffer und Lösungen

<b>Puffer bzw. Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Amidoschwarz-Lösung-1	0,1 % (w/v) Amidoschwarz 25 % (v/v) Isopropanol 10 % (v/v) Essigsäure
Amidoschwarz-Lösung-2	0,5 % (w/v) Amidoschwarz 45 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
Amidoschwarz-Entfärbelösung-1	25 % (v/v) Isopropanol 10 % (v/v) Essigsäure
Amidoschwarz-Entfärbelösung-2	47,5 % (v/v) Methanol 5 % (v/v) Essigsäure
Äquilibrierungspuffer für 2D-Gelelektrophorese	50 mM Tris/HCl, pH 6,8 6 M Harnstoff 30 % Glycerin 2 % SDS
Ca <sup>2+</sup> -Aufnahme-Puffer	100 mM KCl 40 mM Imidazol 10 mM Natriumazid 5 mM Kaliumoxalat 4,5 mM Magnesiumchlorid 1 mM Ruthenium Red 0,025 mM CaCl <sub>2</sub> 0,08 mM EGTA
Ca <sup>2+</sup> -Lyse-Puffer	40 mM Imidazol, pH 7,0
Coomassie-Färbelösung	20 % Methanol 10 % Ammoniumsulfat 10 % Phosphorsäure 0,12 % Coomassie Brilliant Blue G-250

Krebs-Henseleit-Puffer	118,1 mM NaCl 25 mM NaHCO <sub>3</sub> 8,3 mM Glukose 4,7 mM KCl 2 mM CaCl <sub>2</sub> 2 mM Natrium-Pyruvat 1,2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,2 mM MgSO <sub>4</sub>
2 x Lämmli-Puffer (Laemmli 1970)	125 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,0 100 mM DL-Dithiothreitol 20 % (v/v) Glycerin 4 % (w/v) SDS 0,002 % Bromphenolblau
1x Laufpuffer	190 mM Glycin 25 mM Tris 0,1 % (w/v) SDS
Lysepuffer für 2D-Gelelektrophorese	7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 4 % CHAPS 1 % DTT 0,2 % Biolyte, pH 3-10 Protease-Inhibitor-Mix (Sigma-Aldrich)
Membran-Lyse-Lösung	80 % Ameisensäure 10 % Essigsäure 10 % Trichloressigsäure
Rehydratisierungspuffer	8 M Harnstoff 20 mM DTT 2 % CHAPS 0,1 % Pharmalyte, pH 3-10
Rinderserumalbumin	1 mg/ml in dH <sub>2</sub> O

RIPA-Puffer	150 mM NaCl 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 10 mM PMSF 1 % (v/v) NP40 (IGEPAL CA-630) 0,5 % (w/v) Desoxycholat 0,1 % (w/v) SDS 5 µl Protease-Inhibitor-Mix (#P8340, Sigma)/100 mg Gewebe
Sammelgel (5 %)	0,5 M Tris pH 6,8 0,625 ml 10 % SDS 50 µl dH <sub>2</sub> O 4 ml 40 % Acrylamid / Bis-acrylamid 37.5:1 375 µl Temed 5 µl APS 10 % - 0,1 g/ml 50 µl
TBS-T	150 mM NaCl 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 0,1 % (v/v) Tween20
TBS-TB	150 mM NaCl 10 mM Tris/HCl pH 7.4 0,1 % (v/v) Tween20 5 % (w/v) Rinderserumalbumin
Transferpuffer	190 mM Glycin 25 mM Tris 20 % (v/v) Methanol
Trenngel (10 %)	3 M Tris pH 8,8 1 ml 10 % SDS 75 µl dH <sub>2</sub> O 4,5 ml 40 % Acrylamid / Bis-acrylamid 37.5:1 1,8 ml Temed 5 µl APS 10 % - 0,1 g/ml 25µl

## 2.3 Antikörper

*Tabelle 2-3 Im Immunoblot und in der Immunopräzipitation verwendete Primärantikörper*

<b>Primärantikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
Phospho-(Ser/Thr) PKA Substrat Antikörper	Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA	1:3000
p-Tyr (PY350) Anti-Phosphotyrosin Antikörper	Santa Cruz Biotechnologie, Santa Cruz, CA, USA	1:1000 bis 1:5000
Phosphoserin Antikörper (ab9332)	Abcam, Cambridge, UK	1:1000 bis 1:5000
Phospholamban (phospho Ser16) Antikörper	Abcam, Cambridge, UK	1:3000

*Tabelle 2-4 Im Immunoblot verwendete Sekundärantikörper*

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
goat anti-rabbit IgG, HRP konjugiert, sc-2004	Santa Cruz Biotechnologie, Santa Cruz, CA, USA	1:5000

## 2.4 Geräte und Materialien

*Table 2-5 Verwendete Geräte und Materialien*

<b>Geräte und Materialien</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Blot-Papier	Whatman-Papier	Schleicher und Schuell, Maidstone, England
2D- Elektrophoresekammern	Protean-XL-Kammer Mini-Protean-II-Kammer	Bio-Rad, München
2D-Fokussierung	Protean® IEF Cell	Bio-Rad, München
Densitometer, Scanner	Molecular Imager GS-800 Calibrated Densitometer Quantity One® Version 4.4.1	Umax Systems GmbH, Willich Bio-Rad, München
Dismembrator	Mikro-Dismembrator	B.Braun, Melsungen
Elektrischer Druckwandler	Combitrans	B.Braun, Melsungen
Elektromagnetisches Flussmessgerät	MDL 401, Skalar Medical B.V.	Delft, Niederlande
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN®3 Electrophoresis Cell, PowerPac 200+300 Power Supply	Bio-Rad, München
ELISA-Microplate- Reader	Microplate Reader Model 550	Bio-Rad, München
Fluoreszenzimager	Taiphon 8600 Imager	GE Healthcare Europe, München
IPG-Streifen	ReadyStrip	Bio-Rad, München
Kaltlichtquelle	Schott KL 1500 <sub>LCD</sub>	Schott, Mainz
Langendorff-Apparatur	Eigenkonstruktion	Universitätsklinikum Düsseldorf
MacLab/8s- Computersystem	Chart®-Software,	ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australien
Nitrozellulosemembran	Protran Nitrozellulosemembran	Schleicher und Schuell, Maidstone, England

---

RNA-Messung	Nanodrop-1000	Peqlab, Erlangen
Operationsbesteck	Aesculap	Aesculap AG, Tuttlingen
Opticon 1	MJ-Research	Waltham, MA, USA
Orbitalschüttler	Mini Rocking Platform	Biometra, Göttingen
Protein-Transfer (Western-Blot)	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
PVDF-Membran	Immobilon-P	Millipore, Bedford, USA
Real Time PCR-Gerät	Applied Biosystems 7300 Real- Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Röntgenfilm	Hyperfilm ECL	Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien
Stereomikroskop	Stemi 2000	Zeiss, Oberkochen
Szintillationszähler	LS6000IC	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R (kühlbar)	Eppendorf, Hamburg

## 2.5 Das Langendorff-Modell der Maus

### 2.5.1 Tiere und Futter

Die in dieser Arbeit verwendeten Phospholamban-defizienten Mäuse stammen aus der Zucht von Frau Prof. Kranias, die dieses Mausmodell zur Untersuchung der Auswirkung einer Phospholambandefizienz auf die kardiale Kontraktilität und die Bedeutung für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase erzeugt und verwendet hat (Luo *et al.*, 1994). Eine Weiterzuchtung dieses Stammes wurde uns freundlicherweise mit Einverständnis von Frau Prof. Kranias durch Prof. Dr. Lutz Hein (Pharmakologisches Institut der Medizinischen Fakultät der Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt und in der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf weitergezüchtet. Diese Mäuse haben den genetischen Hintergrund eines FVB-Inzuchtstammes und sind homozygot phospholamban-defizient ( $\text{PLN}^{-/-}$ ). Sowohl die Wildtyp-Mäuse als auch die  $\text{PLN}^{-/-}$ -Mäuse wurden unter den gleichen standardisierten Bedingungen gehalten und vermehrt. Dabei wurden männliche und weibliche Wildtyp und  $\text{PLN}^{-/-}$ -Mäuse in einem konstanten zwölf Stunden Tag- und Nachtrhythmus gehalten und erhielten Futter und Wasser *ad libitum*. Alle Tiere wurden mit einer speziellen Futtermischung der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH aus Soest gefüttert. Die Mäuse erhielten ssniff<sup>®</sup>NM (Alleinfuttermittel für die Zucht und Haltung von Nacktmäusen). Die Wildtyp- und Phospholamban-defizienten Mäuse wurden zehn bis 16 Wochen mit dem ssniff<sup>®</sup>NM Nacktmausfutter gefüttert, bis sie ein Gewicht von 24 g bis 30 g pro Tier erreicht hatten und für die Versuche verwendet werden konnten.

### 2.5.2 Die Langendorff-Apparatur

Die für diese Untersuchungen verwendete Langendorff-Apparatur wurde im Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf hergestellt und für Mäuserherzen adaptiert. Das Perfusionsmedium wurde dem Herzen mit einem konstanten Druck von 80 mmHg zugeführt, entsprechend einer Wassersäule von 105 cm Höhe. Der in der Säule befindliche Krebs-Henseleit-Puffer wurde über einen beheizten Wärmemantel auf  $37,5 \pm 0,2$  °C erwärmt und über einen Schlauch kontinuierlich mit Carbogen begast. Die elektrische Stimulation der Herzen erfolgte über einen Rechteck-Pulsgenerator mit dem eine Frequenz von 500 Impulsen/min (Impulslänge 4 ms, Impulsstärke 0,1 – 2 Volt) eingestellt wurde. Das Herz befand sich während der Versuche ebenfalls in einem beheizten Mantelgefäß mit elektronischer Temperatursteuerung. Durch einen in den Boden des Wärmebechers integrierten Rührer wurde eine gleichmäßige Wärmeverteilung in der Perfusionslösung sichergestellt und so eine Beibehaltung der Herztemperatur, insbesondere während der Abschaltung der Perfusion in der Ischämiephase, sichergestellt.

### 2.5.3 Präparation der Mäuseherzen

Nach dem Töten der Tiere durch zervikale Dislokation wurde der Thorax der Mäuse desinfiziert und eröffnet. Der gesamte Herz-Lungen-Trakt wurde entnommen und sofort in eisgekühlten Krebs-Henseleit-Puffer überführt. Dort verblieb das Herz während der restlichen Präparationsdauer. Lunge und Thymus sowie das perikardiale Fettgewebe wurden sorgfältig entfernt und die Aorta vor dem ersten Gefäßabgang (*Truncus brachiocephalicus*) durchtrennt. Eine Kanüle, über die die spätere retrograde Perfusion erfolgte, wurde in die Aorta eingeführt und durch eine Ligatur fixiert. Der linke Vorhof wurde durch einen möglichst kleinen Schnitt eröffnet und das Herz anschließend in die Langendorff-Apparatur eingebracht. Durch den Schnitt im linken Vorhof wurde ein flüssigkeitsgefüllter Latexballon in den linken Ventrikel eingeführt. Anschließend wurde eine Schrittmacher-Elektrode aus zwei

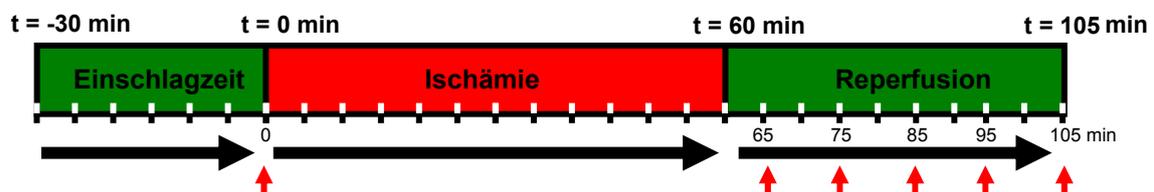
Platin-Iridium-Drähten (Abstand 1 mm), am rechten *Atrium* angelegt und das Herz mittels des Pulsgenerators mit einer Frequenz von 500 Impulsen/min stimuliert.

Die Präparationsdauer, d.h. die Zeit zwischen Eröffnung des Thorax und retrograder Perfusion in der Langendorff-Apparatur, betrug in allen Fällen weniger als sieben Minuten. Herzen mit einer Flussrate von über 4,5 ml/min, was gewöhnlich auf einen Riss in der Aorta zurückzuführen war, und/oder Herzen mit einem links ventrikulär entwickelten Druck ( $\Delta$ LVP) kleiner als 60 mmHg, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

### 2.5.4 Das Ischämie-/Reperfusion-Protokoll

Vorversuche hatten ergeben, dass Trapidil (TPD) ähnlich wie im Kaninchen (Sichelschmidt *et al.*, 2003), keine Eigenwirkung auf die Funktionsparameter der nicht ischämischen Herzen hat. Daher wurde für die Hauptversuche zur Beibehaltung einer gleich langen Inkubationsdauer bei den mit Trapidil zu behandelnden Herzen die Substanz von Beginn an ( $t = -30$  min), das heißt schon während der Einschlagzeit, dem Perfusionmedium zugesetzt.

Um identische Versuchsbedingungen für alle Versuchsgruppen sicherzustellen wurde das in Abbildung 2-1 dargestellte Protokoll einheitlich verwendet.



#### Abbildung 2-1 Protokoll der Ischämie-/Reperfusion für alle Versuchsgruppen

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des standardisierten Ischämie-/Reperfusionprotokolls mit der 30-minütigen Einschlagzeit zur Stabilisierung der funktionellen Parameter. Ab dem Zeitpunkt  $t = 0$  min wurde die Perfusion unterbrochen und damit die Ischämie eingeleitet. Diese wurde für einen Zeitraum von 60 Minuten aufrechterhalten. Darauf folgte eine Reperusionsphase von 45 Minuten. Zu den mit roten Pfeilen gekennzeichneten Zeitpunkten  $t = 0$ , 65, 75, 85, 95, und 105 min wurden Proben des Perfusats für die Messung der CK entnommen. Die Auswertung der funktionellen Parameter erfolgte ebenfalls zu den Zeitpunkten  $t = 0$ , 65, 75, 85, 95, und 105 min.

Nachdem die Herzen nach 30 Minuten stabile vaskuläre und kardiale Parameter aufwiesen, wurde der Zeitpunkt  $t = 0$  min definiert und die Perfusion zur Generierung einer Ischämie für 60 Minuten vollständig unterbrochen („no-flow“-Ischämie). Anschließend erfolgte durch Wiederherstellung des Flusses ( $t = 60$  min) eine druckkonstante Reperfusion für 45 Minuten. Nach Versuchsende ( $t = 105$  min) wurden die Herzen aus der Langendorff-Apparatur entnommen, oberflächlich anhaftende Flüssigkeit entfernt, gewogen, für weitere Untersuchungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

In allen Ischämie/Reperfusion (I/R)-Versuchen mit Trapidil wurde die Substanz in einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  verwendet. Vor Ischämiebeginn ( $t = 0$  min) und im

Verlauf der Reperfusion wurde zu den Zeitpunkten  $t = 65, 75, 85, 95$  und  $105$  min jeweils  $1$  ml des aus dem Herzen austretenden Perfusates für die Messung der Kreatinkinase-Aktivität aufgefangen und auf  $4^{\circ}\text{C}$  gekühlt bis zur Messung aufbewahrt. (Abbildung 2-1).

Insgesamt wurden vier Versuchsgruppen verwendet. Zur Untersuchung der kardioprotektiven Wirkung von Trapidil in der Maus wurden Herzen aus WT-Tieren ohne (I/R) und mit  $10 \mu\text{M}$  Trapidil (I/R + TPD) nach Standardprotokoll perfundiert.

Um eine Beteiligung von Phospholamban an der protektiven Wirkung zu klären wurden die Herzen PLN-defizienter Mäusen ebenfalls einer Ischämie/Reperfusion nach Standardprotokoll ohne (I/R PLN<sup>-/-</sup>) und mit  $10 \mu\text{M}$  Trapidil (I/R PLN<sup>-/-</sup> + TPD) unterzogen. Sofern nicht anders vermerkt, konnten die Daten von 16 bis 18 Tieren pro Versuchsgruppe ausgewertet werden.

## 2.6 Funktionelle Messungen

Nach Einbringen des Herzens in die Langendorff-Apparatur und Platzierung des wassergefüllten Ventrikelballons, der mit einem Druckwandler verbunden war, begann die Aufzeichnung der funktionellen Parameter zum Zeitpunkt  $t = -30$  min. Durch die direkte Verbindung des Ventrikelballons mit dem Druckwandler (Combitrans, B.Braun, Melsungen) über eine Wassersäule wurde der linksventrikulär aktiv entwickelte Druck ( $\Delta\text{LVP}$ ) und der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) des Herzens gemessen.

Aus dem Signal des linksventrikulär aktiv entwickelten Druckes wurde die erste Ableitung nach der Zeit sowohl für die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit ( $+\text{dp}/\text{dt}$ ) als auch für die maximale Relaxationsgeschwindigkeit des Herzens ( $-\text{dp}/\text{dt}$ ), errechnet. Die Parameter  $\Delta\text{LVP}$  und die erste Ableitung nach der Zeit ( $+\text{dp}/\text{dt}$ ) geben Auskunft über die Inotropie des Herzens.

Der LVEDP und die Relaxationsgeschwindigkeit reagieren besonders empfindlich auf Veränderungen im zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel (Lee *et al.*, 1987). Dabei ist die Relaxationsgeschwindigkeit ein funktioneller Parameter für die Effektivität und die Geschwindigkeit des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportes aus dem Zytosol in das sarkoplasmatische Retikulum (SR). Eine Verminderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR führt zu steigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im Zytosol und damit zu einer diastolischen

Kontraktur der Herzen. Eine Erhöhung des LVEDP ist damit ein Indikator für die Überladung des Zytosols mit  $\text{Ca}^{2+}$ . Durch die Kontraktur des Herzens während I/R, ausgelöst durch die gesteigerte zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, kommt es auch zu einer Verschlechterung der diastolischen Perfusion des Myokards. Da die Versorgung des Herzens mit Blut bzw. Perfusionsmedium überwiegend in der Diastole erfolgt, wird die Sauerstoffversorgung des Myokards durch die ischämische Kontraktur weiter verschlechtert.

Als Parameter für die Kontraktion bzw. Dilatation der Gefäße diene in diesem Modell die Koronarperfusion. Der Vorteil einer druckkonstanten Perfusion mit einer kontinuierlichen Messung des koronaren Flusses liegt in der hohen Sensitivität gegenüber einer veränderten Kontraktion bzw. Relaxation der Koronargefäße, sowie den – im Gegensatz zur früher verwendeten volumenkonstanten Perfusion der Kaninchenherzen – physiologischeren Versuchsbedingungen. Der Koronarfluss wurde mittels eines elektromagnetischen Flussmessgerätes (MDL 401, Skalar Medical B.V., Delft, Niederlande) gemessen.

Während des gesamten Versuches wurden alle funktionellen Parameter kontinuierlich unter Verwendung eines MacLab/8s-Computersystems aufgezeichnet ( $\Delta\text{LVP}$ ,  $+\text{dp}/\text{dt}$ ,  $-\text{dp}/\text{dt}$  LVEDP, Koronarperfusion) und ausgewertet (Chart®-Software, ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australien).

Sämtliche Parameter wurden vor der Ischämie ( $t = 0$  min) und über die gesamte Dauer der Reperfusion erfasst und in den Ergebnissen dargestellt. Dabei erfolgte die Auswertung der funktionellen Parameter ( $\Delta\text{LVP}$ ,  $+\text{dp}/\text{dt}$ ,  $-\text{dp}/\text{dt}$ , LVEDP und Koronarperfusion) in den Versuchsgruppen mit WT- und  $\text{PLN}^{-/-}$ -Tieren zu jeweils identischen Zeitpunkten ( $t = 0, 65, 75, 85, 95$  und  $105$  min).

## 2.7 Biochemische Messungen

### 2.7.1 Bestimmung der Kreatinkinase in den Perfusaten

Als Marker für Entwicklung und Schweregrad der ischämischen Myokardschädigung diente die Bestimmung der Kreatinkinase (CK)-Aktivität im Effluat der Herzen. Dieses intrazelluläre Enzym wird bei einer Zellschädigung, die mit einem Verlust der Membranintegrität verbunden ist, freigesetzt und in das Perfusat ausgewaschen. Die Kreatinkinase-Aktivität im Perfusat ist damit ein direktes Maß für die zelluläre Schädigung des Herzens durch Ischämie/Reperfusion (I/R).

Für die Messung der CK wurde vor Beginn der Ischämie ( $t = 0$  min) und im Verlauf der Reperfusion ( $t = 65, 75, 85, 95$  und  $105$  min) das Effluat unmittelbar nach Austritt aus dem Herzen aufgefangen und die CK-Aktivität mittels eines Kits (Creatine kinase, Cypress Diagnostics, Belgien) bei  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  nach Herstellerangaben bestimmt.

Die Messung der CK erfolgte in den Versuchsgruppen mit WT-Mäusen (I/R und I/R + TPD) und in den Versuchsgruppen mit Phospholamban-defizienten Mäusen (I/R  $\text{PLN}^{-/-}$  und I/R  $\text{PLN}^{-/-}$  + TPD) zu identischen Zeitpunkten photometrisch bei  $340\text{ nm}$ . Der Test beruht auf der Umsetzung von  $\text{NADP}^{+}$  zu  $\text{NADPH} + \text{H}^{+}$ . Trapidil hatte in der verwendeten Konzentration von  $10\text{ }\mu\text{M}$  keinen Einfluss auf den Kreatinkinase-Assay.

### 2.7.2 Bestimmung der $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum

Der zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase kommt bei Gewebeischämie eine besondere Bedeutung zu. Ischämie und im Besonderen die Reperfusion führt nach Wiederherstellung der Durchblutung, bzw. der Koronarperfusion mit entsprechender Pufferlösung, zu einem massiven Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Kardiomyozyten. Diese zytosolische Überladung der Zellen mit  $\text{Ca}^{2+}$  führt zu einer Zunahme der Kontraktilität (Kontraktur) und ist entscheidend für die myokardiale Gewebeschädigung, da sie auch den Sauerstoffverbrauch des Herzens bestimmt. Als kausaler Faktor von besonderer mechanistischer Bedeutung ist eine gestörte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR (Schoutsen *et al.*, 1989) anzusehen. Die  $\text{Ca}^{2+}$  Aufnahme in das SR entspricht einer funktionellen Inaktivierung, da das  $\text{Ca}^{2+}$

dadurch aus dem Zytosol und von den kontraktile Myofibrillen entfernt wird. Funktioneller Ausdruck einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung des Zytosols ist der Anstieg des enddiastolischen Drucks.

Wenn Trapidil über den Phospholamban-Mechanismus kardioprotektiv wirken sollte, dann müsste sich dies in einer veränderten Kinetik der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR äußern. Mit einer steigenden Phosphorylierung von PLN durch Trapidil wäre eine beschleunigte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR zu erwarten. Bei PLN-defizienten Tieren sollte dieser Effekt fehlen.

### **2.7.2.1 Gewinnung von Homogenaten für die Bestimmung der $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme**

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR wurde am Ende des Versuchsprotokolls gemessen. Die Herzen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur Homogenisierung des Gewebes vollständig in ein ebenfalls in flüssigem Stickstoff gekühltes Teflongefäß mit einer frei beweglichen Stahlkugel überführt und in einem Mikro-Dismembrator (B.Braun, Melsungen) durch schnelle Oszillation zerkleinert. Das Gewebepulver wurde in einem vorgekühlten Potter-Homogenisator mit 1,5 ml  $\text{Ca}^{2+}$ -Homogenisierung-Puffer pro 100 mg Gewebe versetzt und unter Kühlung mit 30 Hüben homogenisiert. Das Homogenat wurde für eine Minute bei 100 x g zentrifugiert um nicht zerkleinertes Gewebe abzutrennen. Vor der Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme wurden zwei Aliquots des Homogenates mit jeweils vier Volumen RIPA-Puffer versetzt und einer Proteinbestimmung unterzogen. Die Proteinkonzentration wurde dann in allen Proben mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Homogenisierung-Puffer auf 1 mg/ml eingestellt.

### 2.7.2.2 Messung der Geschwindigkeit der $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR

Der von der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA2a)-katalysierte Transport von  $\text{Ca}^{2+}$  in die präparierten Membranvesikel des SR wurde als Oxalat-stimulierte  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme nach einer von Will *et al.* adaptierten Methode bestimmt (Will *et al.*, 1983). Bei dieser Methode wird das in das Lumen des SR transportierte radioaktive  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  von passiv aufgenommenen Oxalatanionen als schwer lösliches Salz ausgefällt. Gleichzeitig wird der Efflux von  $\text{Ca}^{2+}$  durch den Ryanodin-Rezeptor durch Ruthenium Rot blockiert. Durch die Präzipitation des im SR vorliegenden  $\text{Ca}^{2+}$  bleibt die freie Konzentration an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen trotz des blockierten Ausstroms gering. Durch diese Wirkung des Oxalats wird der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in das SR um den Faktor 100 verstärkt. Durch diese Verstärkung ist eine direkte Transportmessung unter Verwendung von radioaktivem  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  möglich.

Die Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme erfolgte in allen Versuchen bei einer freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 200 nmol/l (1 mCi  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /ml).

Zur Messung wurden 0,35 ml Homogenat zu 2,8 ml  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme-Puffer gegeben und für fünf Minuten vorinkubiert um den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom („leakage“) über den Ryanodin-Rezeptor vollständig zu inhibieren. Die eigentliche Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme erfolgte nach Vorinkubation durch Zugabe von Natrium-ATP bis zu einer Endkonzentration von 5 mM ( $t = 0$  min). Zu den Zeitpunkten  $t = 1, 3$  und 5 min wurden je zweimal 500  $\mu\text{l}$  entnommen und sofort durch einen 0,45  $\mu\text{m}$  Membran-Filter unter Verwendung einer Vakuumpumpe filtriert. Dabei blieb das mit  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -angereicherte SR auf dem Filter zurück. Durch zweimaliges Waschen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahmepuffer wurde unspezifisch anhaftendes  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  entfernt. Die Nitrozellulose-Filter wurden in Szintillations-Messküvetten gegeben und mit 0,5 ml Aceton sowie 5 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Anschließend wurde die aufgenommene Radioaktivität im Szintillationszähler (Beckmann Coulter, Krefeld) vermessen. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme wurde auf die eingesetzte Proteinmenge bezogen und als *counts/min* x  $\mu\text{g}$  Protein berechnet.

## 2.8 Western-Blot

### 2.8.1 Proteingewinnung aus Herzgewebe nach Ende der Perfusion

Zur Gewinnung von Proteinen wurden die Mäuseherzen nach Versuche durch Abtupfen von oberflächlich anhaftender Flüssigkeit befreit und danach in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Herzen wurden, wie in 2.7.2.1 beschrieben, zerkleinert. Das so gewonnene feine Pulver wurde umgehend in eisgekühlten RIPA-Puffer (1 ml pro Herz, entspricht ca. 140 – 200 mg Gewebe) überführt und gelöst. Unmittelbar danach wurden die Lysate zehn Minuten bei 80°C erhitzt und nachfolgend für fünf Minuten bei 13000 x g und 4°C zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Aus dem Überstand wurden bei 4 °C aufbewahrte Aliquots für eine Proteinbestimmung entnommen. Der restliche Überstand wurde sofort mit einem äquivalenten Volumen 2 x Lämmli versetzt, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.8.2 Proteinbestimmung aus RIPA-Puffer

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der DC Protein Assay (#500-0112, Bio-Rad, München) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Die in diesem Assay verwendete Methode zur Proteinbestimmung wurde von Lowry *et al.* entwickelt und beruht im Wesentlichen auf einer modifizierten Biuretreaktion bei der ein photometrisch quantitativ messbarer Farbkomplex entsteht (Lowry *et al.*, 1951). Für jede Proteinbestimmung wurde eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin erstellt. Die photometrische Vermessung erfolgte mittels eines ELISA-Microplate-Reader (Microplate Reader Model 550, Bio-Rad, München) bei einer Wellenlänge von 595 nm.

### **2.8.3 Auftrennung der Proteine**

Die Auftrennung und Analyse der so gewonnenen Proteine erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach der Methode von Fling und Gregerson (Fling und Gregerson 1986). Die Acrylamidkonzentration in den Sammelgelen betrug 5 %, die Konzentration in den Trenngelen variierte je nach Größe der zu untersuchenden Proteine zwischen 10 % und 14 %. Analysiert wurden jeweils 10 µg Herzprotein. Neben den Proteinproben wurde ein Molekulargewichts-Marker (Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa, Fermentas, St. Leon-Rot) auf dem Gel mitgeführt. Nach vollständiger Auftrennung wurden die Proteine auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Immobilon-P, Millipore, Bedford, USA) übertragen. Dazu wurde die PVDF-Membran zunächst durch eine 30 Sekunden dauernde Inkubation in Methanol aktiviert und anschließend für eine Minute zur Äquilibration in Transferpuffer überführt. Der Transfer erfolgte in einer 'Semi-Dry'-Blot-Apparatur (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad, München) bei 12 V für 60 Minuten. Nach dem Transfer wurden die Membranen für mindestens 60 Minuten bei RT in TBS-TB inkubiert um freie Bindungsstellen abzusättigen und unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu verringern.

### **2.8.4 Detektion spezifischer Proteine**

Die auf den PVDF-Membranen immobilisierten Proteine wurden mit spezifischen Primärantikörpern detektiert. Eine Liste der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie die jeweils eingesetzten Verdünnungen findet sich in den Tabellen 2-3 und 2-4. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte in allen Fällen bei 4 °C über Nacht. Nachfolgend wurde die Membran für dreimal fünf Minuten in TBS-T gewaschen und anschließend mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (je nach Art des Primärantikörpers s. Tabelle 2-3, Verdünnung jeweils 1:3000 in TBS-TB) für mindestens 60 Minuten bei RT inkubiert. Um nicht gebundenen Sekundärantikörper zu entfernen wurden die PVDF- Membranen erneut in TBS-T gewaschen, diesmal dreimal zehn Minuten bei Raumtemperatur. Zur

Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers folgte eine Inkubation mit ECL-Reagenz (Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien). Die an den Sekundärantikörpern gebundene Peroxidase oxidiert das im ECL-Reagenz enthaltenen Luminol und die resultierende Lichtemission konnte mittels Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien) detektiert werden.

### **2.8.5 Proteinbeladung der Membran und densitometrische Auswertung**

Nach der Belichtung des Röntgenfilms wurden die PVDF-Membranen noch einmal 15 Minuten in TBS-T und anschließend 15 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Nachfolgend wurden die membrangebundenen Proteine für zehn Minuten mit Amidoschwarz-Lösung-1 angefärbt. Amidoschwarz bindet irreversibel an die auf der Membran immobilisierten Proteine. Es folgte eine Entfärbung (Amidoschwarz-Entfärbelösung-1) für zweimal zehn Minuten. Nach Entfernung des überschüssigen Farbstoffes durch die Amidoschwarz-Entfärbelösung-1 wurden die Proteinbanden auf der PVDF-Membran sichtbar. Die Signale auf den Membranen wurden mit einem kalibrierten Scanner aufgenommen (GS-800 Densitometer, Bio-Rad, München) und densitometrisch ausgewertet (Software QuantityOne, Bio-Rad, München). Die Auswertung der entwickelten Röntgenfilme wurde nach dem gleichen Verfahren durchgeführt.

## 2.9 Einfluss von Trapidil auf die Proteinexpression

Aus früheren Untersuchungen war bereits bekannt, dass Myokardischämie sowohl in Kaninchenherzen (Schrör *et al.*, 1998a) als auch in Mäuseherzen (Martin *et al.*, 2005) zu massiven Veränderungen der Genexpression führt. Analoge Veränderungen ließen sich durch cAMP-Erhöhung bzw. PKA-Aktivierung in glatten Gefäßmuskelzellen zeigen (Meyer-Kirchrath *et al.*, 2004). Diese transkriptionellen Veränderungen werden relevant für ischämische Prozesse und anti-ischämische Pharmakonwirkungen wenn sie in entsprechende Proteine translatiert werden. Eine veränderte Proteinexpression nach Ischämie/Reperfusion wurde von uns für die cAMP-abhängige Aktivierung des COX-2 Gens (Schrör *et al.*, 1998a) und den myokardialen EP<sub>3</sub>-Rezeptor (Martin *et al.*, 2005) gezeigt. Da Trapidil cAMP-abhängig die PKA aktiviert, lag der Gedanke nahe, dass auch hier Veränderungen in der Proteinexpression eintreten können. Daher wurden in einem weiteren Ansatz die Veränderungen in der Proteinexpression durch Trapidil während Ischämie/Reperfusion untersucht.

Um diese Fragestellung bearbeiten zu können, ist ein Verfahren wünschenswert, mit dem auch Veränderungen im Expressionsmuster von bisher nicht bekannten Zielproteinen detektiert werden können. Hierzu bietet sich die 2D-Gelelektrophorese an. Dieses Vorgehen erlaubt, einen großen Teil des Proteoms zeitgleich zu untersuchen. Mit Hilfe dieser Methode werden Proteine zuerst nach ihrem isoelektrischen Punkt und anschließend nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dadurch entstehen einzelne Protein-Spots, hinter denen sich in der Regel ein einzelnes Protein verbirgt. Mit Hilfe dieser Technik ist es möglich, die Proteome mehrerer Herzen miteinander zu vergleichen, um unterschiedlich regulierte Proteine zu identifizieren.

### **2.9.1 Proteingewinnung für die 2D-Elektrophorese**

Zur Gewinnung von Proteinen wurden Mäuseherzen wie zuvor beschrieben verwendet. Das Gewebepulver der tiefgefrorenen Herzen wurde in eisgekühlten Lyse-Puffer (2 ml pro Herz, entspricht ca. 140 – 180 mg Gewebe) überführt und dort für 30 Minuten unter gelegentlichem Rühren bei RT inkubiert. Zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile wurden die Lysate nachfolgend für 30 Minuten bei 16000 x g und 4°C zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden Aliquots für eine Proteinbestimmung (siehe 2.8.2) entnommen. Der restliche Überstand wurde zur weiteren Verwendung aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### **2.9.2 Proteinbestimmung aus Lysepuffer für die 2D-Elektrophorese**

Aufgrund der Inkompatibilität der meisten Methoden zur Proteinbestimmung mit Salzen und Detergentien wurde für die Bestimmung der Proteinkonzentration aus Puffern für die 2D-Elektrophorese eine alternative Methode gewählt (Dieckmann-Schuppert und Schnittler 1997). Dazu wurden je 2 µl der zu vermessenden Probe auf jeweils 1 cm<sup>2</sup> grosse Felder einer Nitrozellulose-Membran aufgetragen und unter leichter Erwärmung getrocknet. Nach 3-facher Auftragung aller zu bestimmenden Proben, sowie einer Eichgeraden aus Rinderserumalbumin, wurde die Membran für zehn Minuten mit Amidoschwarz-Färbelösung-2 inkubiert. Um überschüssige Färbelösung und Hintergrund zu entfernen wurde die Membran wiederholt für dreimal fünf Minuten mit Amidoschwarz-Entfärbelösung-2 gewaschen. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur wurde die Membran in die einzelnen Probenfelder zerteilt und die Einzelteile in je ein Eppendorfgesäß überführt. Zur vollständigen Freisetzung des an die Proteine gebundenen Amidoschwarz wurden die Membranteile für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Membran-Lyse-Lösung unter Schütteln inkubiert. Die Überstände wurden mit einem ELISA-Reader (Microplate Reader Model 550, Bio-Rad, München) bei einer Wellenlänge von 620 nm vermessen und die Proteinkonzentration über eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin ermittelt.

### 2.9.3 Isoelektrische Fokussierung

Die Protean® IEF Cell (Bio-Rad, München) dient zur gleichzeitigen Rehydratisierung und Fokussierung von Immobilisierten-pH-Gradienten (IPG)-Streifen. Die Streifen wurden in den Vertiefungen des Fokussierungs-Trays zusammen mit der Probe hydratisiert und anschließend fokussiert (In-Gel-Rehydratisierung). Dazu wurde ein durch die Streifenlänge definiertes Volumen Probenlösung, bestehend aus Proteinlösung und Rehydratisierungspuffer in die Mitte der Vertiefung pipettiert und so verteilt, dass die Lösung den Boden gleichmäßig bedeckte. Nach Entfernung der Schutzfolie wurde der IPG-Streifen luftblasenfrei mit der Gelseite nach unten in die Vertiefung gelegt. Jede Rehydratisierung erfolgte für 14 Stunden bei 50 V und 20 °C. Anschließend wurden die Streifen ohne Unterbrechung bei einer Stromstärke von maximal 0,05 mA/Streifen und 20°C fokussiert. Für die Fokussierung der IPG-Streifen wurden abhängig von der Länge unterschiedliche Bedingungen verwendet (Tabellen 2-6 und 2-7).

Fokussierungsbedingungen:

IPG-Streifen 17 cm, pH 5 – 8, 150 µg Protein

**Table 2-6** Fokussierungsbedingungen der IPG-Streifen mit 17 cm Länge

Schritt	Spannung (V)	Dauer (h)	Voltstunden
1	250	1	250
2	500	1	500
3	1000	2	2000
4	8000	6	48000

IPG-Streifen 7 cm, pH 3 – 10, 25 µg Protein

**Tabelle 2-7** Fokussierungsbedingungen der IPG-Streifen mit 7 cm Länge

Schritt	Spannung (V)	Dauer (h)	Voltstunden
1	250	1	250
2	500	1	500
3	1000	2	2000
4	4000	3	12000

### 2.9.4 Äquilibrierung der IPG-Streifen vor der zweiten Dimension

Bevor die IPG-Streifen in der zweiten Dimension aufgetrennt werden können, müssen die enthaltenen Proteine mit SDS beladen und einer Reduktion mit anschließender Alkylierung unterzogen werden. Diese ist notwendig, um Streifenbildung durch Reoxidation freier Thiol-Gruppen zu unterbinden. Dazu wurden die IPG-Streifen je zwei mal zehn Minuten unter leichtem Schütteln in einem Reagenzglas mit 10 ml Äquilibrierungspuffer versetzt. Im ersten Schritt wurden die Proteine durch Zugabe von 1 % DTT zum Äquilibrierungspuffer vollständig reduziert. Im zweiten Schritt der Äquilibrierung wurden die nun freien Thiol-Gruppen durch Zusatz von 4 % (w/v) Jodacetamid alkyliert.

### 2.9.5 Auftrennung in der zweiten Dimension

Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgte in vertikalen Polyacrylamid-Tris/Glycin-SDS-Gelen. Für die 17 cm langen IPG-Streifen fand die Bio-Rad Protean XL-Kammer mit 20 x 20 cm<sup>2</sup> großen Gelen Verwendung. Für 20 x 20 cm<sup>2</sup> große Gele wurde der Gießstand auf 4°C gekühlt, um ein vorzeitiges Polymerisieren zu verhindern. Das Gießen der Gele erfolgte analog zu Kapitel 2.8.3. Nach vollständiger Polymerisation und Entfernung des Kamms wurden die äquilibrierten IPG-Streifen direkt zwischen die Glasplatten auf das SDS-Gel gelegt und luftblasenfrei mit warmer Agaroselösung (1 % in Laufpuffer) fixiert. Um ein möglichst gleichmäßiges Einlaufen

der Proteine in die zweite Dimension sicherzustellen wurde die Stromstärke in den ersten zwei Stunden auf 10 mA pro Gel begrenzt. Im Anschluss wurde der Gellauf bei einer konstanten Spannung von 150 Volt fortgesetzt bis die Lauffront das untere Ende der Gelkassette erreichte. Die Gesamtlaufzeit der zweiten Dimension betrug fünf bis sieben Stunden. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine aus den 7 cm IPG-Streifen wurde in der Mini-Protean-II-Kammer (Bio-Rad, München) durchgeführt und erfolgt bei konstanter Stromstärke von 20 mA/Gel, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreichte. Die Gesamtlaufzeit der zweiten Dimension betrug unter diesen Bedingungen zwei bis drei Stunden.

### **2.9.6 Coomassie-Färbung der 2D-Gele**

Nach Beendigung des Gellaufes wurden die 2D-Gele aus den Glaskassetten entnommen und mit destilliertem Wasser dreimal für 15 Minuten gewaschen. Anschließend wurden die Gele in die kolloidale Coomassie-Färbelösung gelegt und auf einem Orbitalschüttler für 24 Stunden inkubiert (Candiano *et al.*, 2004). Nach Abschluss der Färbung wurden die Gele erneut dreimal für 15 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen um den Hintergrund zu entfärben. Anschließend wurden die gefärbten Gele mit einem kalibrierten Scanner (GS-800 Densitometer, Bio-Rad, München) vermessen.

### **2.9.7 Massenspektrometrie**

Die massenspektrometischen Untersuchungen der Gele wurden freundlicherweise durch Dr. Stephan Lehr am Deutschen Diabetes Zentrum in Düsseldorf durchgeführt. Die ausgestochenen Proteinspots wurden dazu mit Trypsin verdaut und die entstandenen Peptide aus dem Gelstück herausgelöst. Die Peptidlösung wurde auf die vorgefertigten Felder eines *prespotted AnchorChip* (Bruker Daltonics Inc., MA, USA) aufgebracht und mit Hilfe eines Ultraflexx-II-MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics Inc., MA, USA) analysiert. Die Massenspektren wurden auf einem hauseigenen Mascot-Server analysiert.

## 2.10 Quantitative RT-PCR (qPCR)

Bei der Untersuchung des Proteoms wurde ein Spot identifiziert, dessen Expression durch die Behandlung mit Trapidil während Ischämie und nachfolgender Reperfusion signifikant reduziert war. Bei differentiell exprimierten Proteinspots in der 2D-Elektrophorese ist es in der Regel nicht möglich die Ebene der Regulation direkt zu ermitteln, da verschiedene Mechanismen, wie ein beschleunigter Abbau, postranslationale Modifikationen oder auch Veränderung der Transkription in Frage kommen.

Um zu untersuchen, ob die Herabregulation des als ECH1 (*Mus musculus* *enoyl coenzyme A hydratase 1, peroxisomal*) identifizierten Proteinspots auf transkriptioneller Ebene erfolgt, wurde mit Hilfe der qPCR das relative Expressionsniveau von ECH1 in unbehandelten und mit Trapidil perfundierten Herzen nach Ischämie/Reperfusion bestimmt.

### 2.10.1 RNA Präparation für die qPCR

Die Präparation von Gesamt-RNA aus Mäuseherzen erfolgte mittels TriReagent® (Sigma-Aldrich, München). Es wurde entsprechend den Angaben des Herstellers verfahren. Dies umfasste eine Ausschüttelung der wässrigen, phenolhaltigen Phase des TriReagents gegen Chloroform, eine Fällung der in der wässrigen Phase angereicherten RNA mit Isopropanol und einen anschließenden Waschschrift mit 70 % Ethanol. Die so erhaltene RNA wurde in RNase-freiem Wasser aufgenommen. Konzentration und Reinheit der RNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm mittels eines Nanodrop-1000 (Pepqlab, Erlangen) photometrisch bestimmt.

### 2.10.2 Durchführung der qPCR

Um eine quantitativ genaue Aussage über das Expressionsniveau der ECH1 machen zu können, wurde diese unter Verwendung eines QuantiTect Primer Assay 200 (Qiagen, Hilden) mittels qPCR bestimmt. Die Quantifizierung der gebildeten doppelsträngigen DNA erfolgte mittels Fluoreszenzmessung innerhalb bzw. am Ende des PCR-Zyklus. Für die qPCR wurden Aliquots von 200 ng Gesamt-RNA zur Synthese von cDNA mit dem *Superscript™III First-Strand synthesis* – System (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die Amplifizierung der PCR-Produkte wurden auf einer Opticon 1 (MJ-Research, Waltham, MA, USA) Platte mittels *SYBR Green® PCR Master Mix* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Beendigung der PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt anhand derer die Anzahl der amplifizierten Produkte überprüft wurde. Der Vergleich der relativen Expressionslevel wurde über die  $2^{\Delta\Delta C(T)}$  Methode durchgeführt. Jede Probe wurde als Dreifachbestimmung analysiert und die Mittelwerte daraus verglichen.

### 2.11 Statistik

Die Messdaten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus n unabhängigen Experimenten angegeben. Das Signifikanzniveau P für  $\alpha$  wurde mit 0,05 festgelegt. Um signifikante Unterschiede zwischen drei oder mehr Versuchsgruppen zu überprüfen wurden die Daten mittels *Two-Way Analysis of Variance* (ANOVA) und nachfolgendem Bonferroni-Test für multiple Vergleiche analysiert. Mit einem ungepaarten t-Test wurden Unterschiede zwischen zwei Versuchsgruppen überprüft. Die statistische Auswertung erfolgte mittels der GraphPad Prism-Software (Version 4.00, GraphPad Software, San Diego, USA).

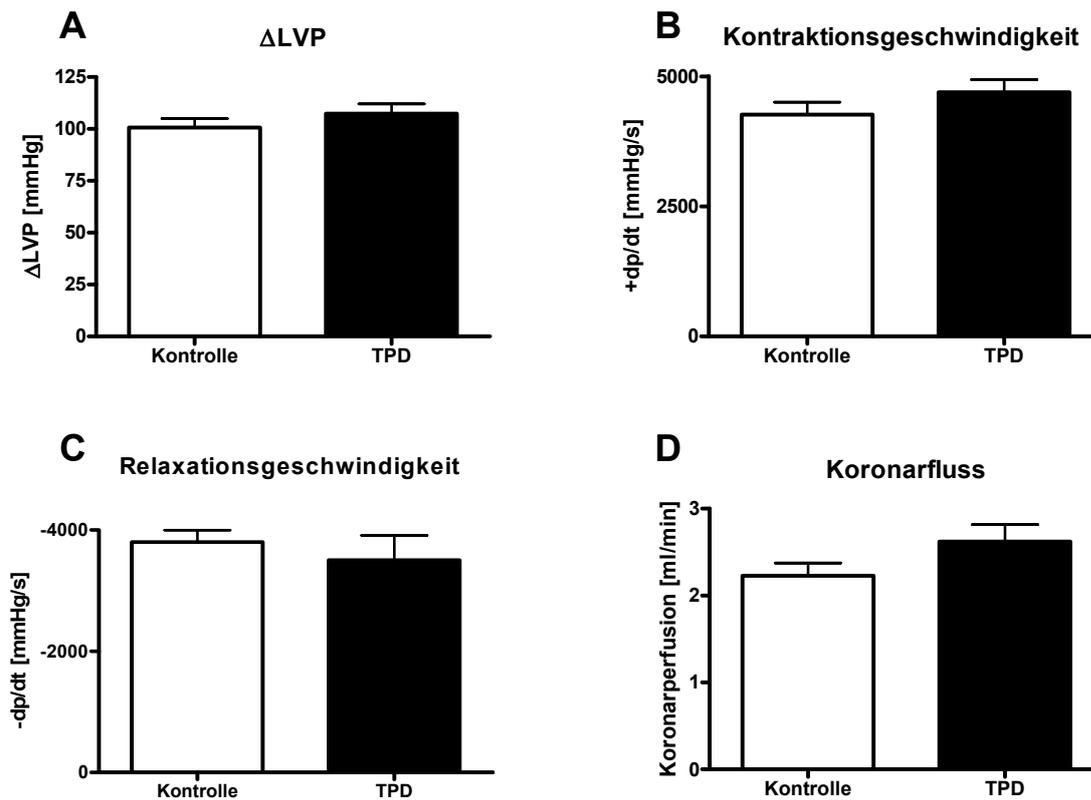
### 3 Ergebnisse

In Vorarbeiten wurden die Grundlagen eines Langendorff-Herzinfarktmodells an der Maus an diesem Institut etabliert und standardisiert. Zur Ermittlung optimaler Versuchsparameter für Detailfragestellungen musste insbesondere ein geeignetes Ischämie/Reperfusionprotokoll erarbeitet werden. Dabei war zunächst zu prüfen, welche Dauer der „no-flow“-Ischämie am druckkonstant perfundierten Herzen erforderlich ist, um eine signifikante Myokardschädigung mit Einschränkung der funktionellen Parameter des Herzens zu erreichen ohne ein totales Sistieren der Kontraktion in der Reperfusion zu verursachen, d.h. einen vollständig irreversiblen Myokardschaden. Die Zeitdauer der globalen „no-flow“-Periode wurde so festgelegt, dass am Ende der Reperusionsphase von 45 Minuten eine Erholung des  $\Delta$ LVP von 30 – 50 % erreicht wurde. Eine weitere Verlängerung der Reperfusion führte nicht zu einer zusätzlichen Verbesserung der Myokardfunktion.

In diesen Versuchen führte eine „no flow“ Ischämiedauer von 30 bis 40 Minuten nicht zu einer signifikanten Änderung des  $\Delta$ LVP. Erst eine Ischämiephase von 50 – 60 Minuten Dauer führte zu einer Einschränkung der Kontraktionskraft um etwa 50 % am Ende der Reperfusion. Darüber hinaus wurden als weitere Parameter zur Validierung der festgelegten Ischämiedauer die Freisetzung von Kreatinkinase-Aktivität in das Perfusat und die Größe der nekrotischen Bereiche im Myokardgewebe untersucht. Eine 60-minütige Ischämie führte zu einer deutlichen Erhöhung der Kreatinkinaseaktivität und einer Infarktgröße von ca. 50 %. Aufgrund dieser Daten wurde die Ischämiedauer für alle folgenden Versuche auf 60 Minuten festgelegt.

#### 3.1 Eigenwirkung von Trapidil in nicht-ischämischen Herzen

Für die gesamte Versuchsserie wurde eine Trapidilkonzentration von 10  $\mu$ M gewählt, da diese in Vorversuchen keinen Einfluss auf die funktionellen Parameter des nicht ischämischen Myokards zeigte. Außerdem war aus Voruntersuchungen bekannt, dass Trapidil in der oben angegebenen Konzentration keine PDE-hemmenden Effekte aufweist, aber signifikant die PKA aktiviert.



### Abbildung 3-1 Einfluss von Trapidil auf die funktionellen Parameter vor Ischämie und Reperfusion

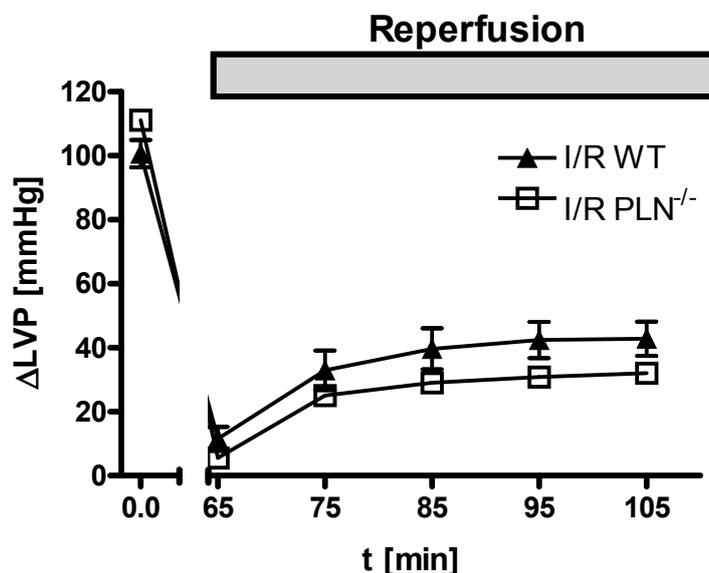
Dargestellt ist der aktiv entwickelte linksventrikuläre Druck,  $\Delta\text{LVP}$  (A), die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit (+dp/dt) (B), die maximale Relaxationsgeschwindigkeit (-dp/dt) (C) und die Koronarperfusion (D) der Mäuseherzen unter Kontrollbedingungen (Kontrolle, weiße Balken) und nach 30-minütiger Perfusion mit 10  $\mu\text{M}$  Trapidil (TPD; schwarze Balken). Für die funktionellen Parameter vor Ischämiebeginn ergaben sich zwischen den Kontrollen und den mit Trapidil behandelten Herzen keine signifikanten Änderungen ( $p > 0,05$ ). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Die Herzen wurden von Versuchsbeginn an mit oder ohne Zusatz von Trapidil perfundiert. Die Parameter, die zum festgelegten Zeitpunkt  $t = 0$  min und damit vor Beginn der Ischämie gemessen wurden, zeigen somit die Effekte von Trapidil auf das nicht ischämische Myokard im Vergleich zu nicht behandelten Kontrollherzen. In der gewählten Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zeigte Trapidil keinen Einfluss auf den linksventrikulär aktiv entwickelten Druck ( $\Delta\text{LVP}$ ), die Kontraktionsgeschwindigkeit, (+dp/dt), Relaxationsgeschwindigkeit (-dp/dt) und den LVEDP der Herzen. Lediglich die Koronarperfusion stieg unter 10  $\mu\text{M}$  Trapidil tendenziell von 2,2 auf 2,6 ml/min an (Abbildung 3-1,  $p > 0,05$ ).

### 3.2 Ischämieprotokoll in WT- und PLN<sup>-/-</sup>-Mäusen

Vor Beginn der Ischämie-/Reperfusion-Versuche mit PLN<sup>-/-</sup>-Mäusen musste an diesem Tierstamm erneut das zuvor festgelegte Ischämieprotokoll überprüft werden. Aus Arbeiten der Gruppe von Kranias war bekannt, dass die Herzen aus diesen Tieren etwas empfindlicher als die entsprechenden Wildtyp-Herzen auf eine Ischämie reagieren. Zur Überprüfung wurden die ersten Mäuse des Zuchtstammes einer Ischämie/Reperfusion nach Standardprotokoll unterzogen (n = 4).

Die Veränderungen der funktionellen Parameter lagen in der gleichen Größenordnung wie in den Wildtyp-Herzen, die demselben Ischämie-/Reperfusionprotokoll unterzogen wurden. Am Versuchsende war der erreichte linksventrikulär aktiv entwickelte Druck auf ca. 30 % des Wertes vor I/R reduziert (Abbildung 3-2). Die weiteren funktionellen Parameter (+dp/dt, -dp/dt, LVEDP und Koronarperfusion) sowie die Kreatinkinase-Freisetzung lagen ebenfalls in einer mit den Wildtypherzen vergleichbaren Größenordnung. Damit konnte das Protokoll für die Ischämie-/Reperfusionversuche der Kontrolltiere unverändert für die Versuche mit den PLN<sup>-/-</sup>-Mäusen übernommen werden.



**Abbildung 3-2 Zeitlicher Verlauf des  $\Delta$ LVP in PLN<sup>-/-</sup>-Herzen bei Ischämie/Reperfusion**

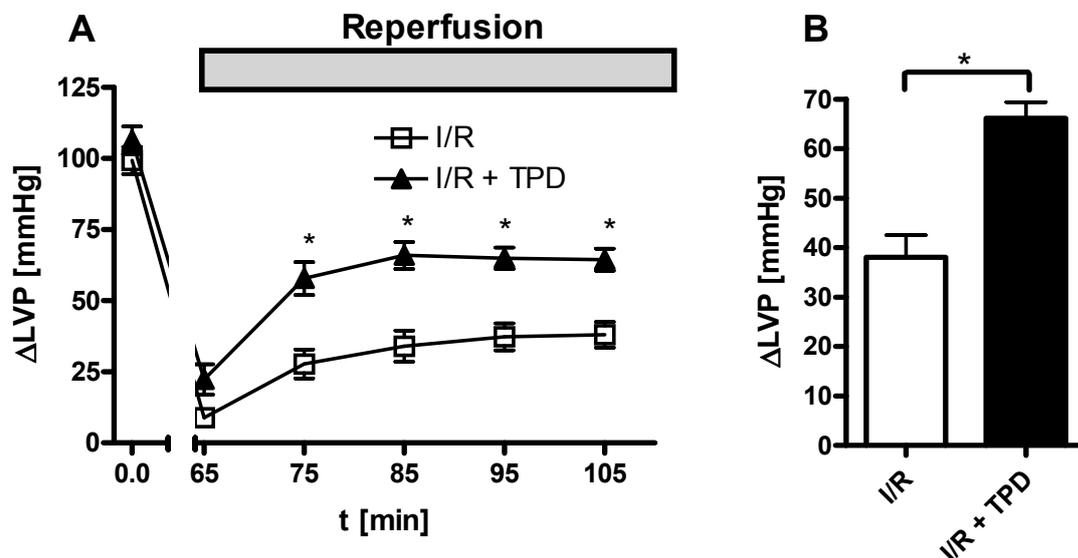
Dargestellt ist der aktiv entwickelte linksventrikuläre Druck  $\Delta$ LVP vor Ischämiebeginn und während der Reperfusion in Herzen aus PLN<sup>-/-</sup>-Tieren. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Signifikante Unterschiede bestanden nicht ( $p > 0,05$ ).

### 3.3 Einfluss von Trapidil auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden in WT-Mäusen

#### 3.3.1 Funktionelle Parameter

##### Linksventrikulär aktiv entwickelter Druck

Eine 60-minütige Ischämie mit nachfolgender Reperfusion führt zu einem starken Abfall des  $\Delta$ LVP der unbehandelten Herzen. Am Ende der Reperfusion erreichten die Herzen nur 40 % der Kontraktionskraft im Vergleich zu Versuchsbeginn. Die Perfusion mit Trapidil erhöhte den  $\Delta$ LVP bereits nach 15 Minuten Reperfusion signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Diese Erhöhung im  $\Delta$ LVP blieb im weiteren Verlauf der Reperfusion annähernd konstant erhalten. Am Ende der Reperfusion zeigten die Trapidil-behandelten Herzen einen fast doppelt so hohen  $\Delta$ LVP von  $66 \pm 3$  mmHg im Vergleich zu  $38 \pm 5$  mmHg in den unbehandelten Kontrollen (Abbildung 3-3,  $p < 0,05$ ).

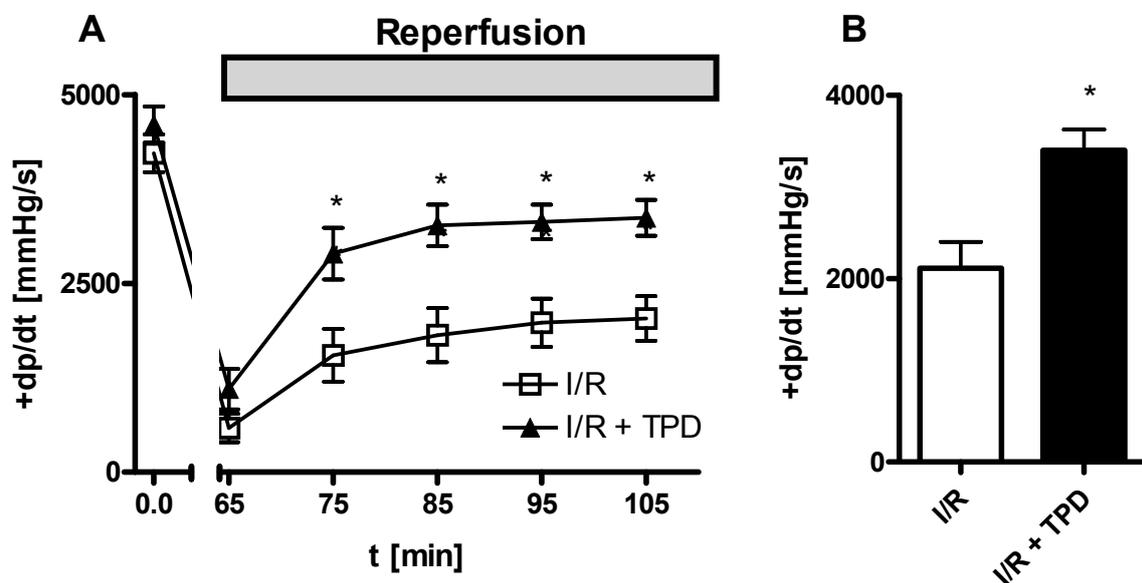


**Abbildung 3-3 Einfluss von Trapidil auf den linksventrikulär aktiv entwickelten Druck**

Dargestellt ist der  $\Delta$ LVP vor Ischämiebeginn und während der Reperfusion (A) für unbehandelte Kontrollherzen (I/R, weiß) sowie für die mit  $10 \mu\text{M}$  Trapidil perfundierten Herzen (I/R + TPD; schwarz). Diagramm B zeigt den signifikant erhöhten  $\Delta$ LVP zu Versuchsende bei t = 105 Minuten unter Perfusion mit Trapidil gegenüber den Kontrollen ( $*p < 0,05$ ). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## Kontraktionsgeschwindigkeit

Analoge Effekte ergaben sich für die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit (+dp/dt). Ischämie/Reperfusion führte zu einer Abnahme von +dp/dt um 52 % im Vergleich zum Versuchsbeginn. In Anwesenheit von Trapidil im Perfusat war die Kontraktionsgeschwindigkeit ab dem Zeitpunkt  $t = 75$  Minuten signifikant erhöht. Am Versuchsende war +dp/dt in den mit Trapidil perfundierten Herzen mit  $3398 \pm 227$  mmHg/s im Vergleich zur Kontrollgruppe mit  $2113 \pm 288$  mmHg/s ebenfalls signifikant erhöht (Abbildung 3-4,  $p < 0,05$ ).

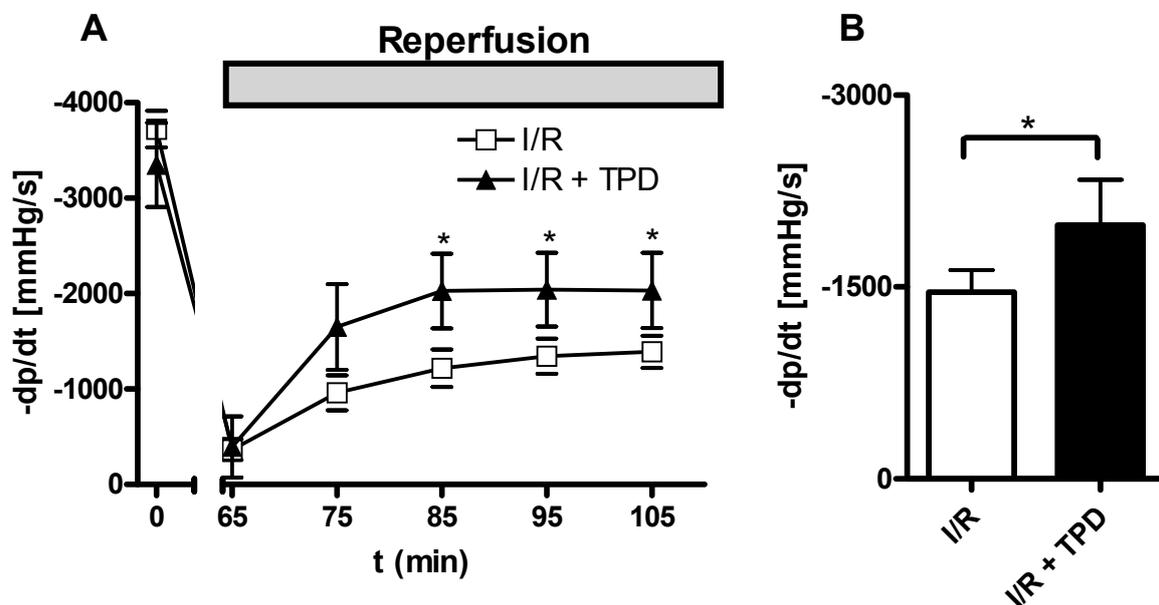


### Abbildung 3-4 Einfluss von Trapidil auf die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit

Dargestellt ist die erste Ableitung des linksventrikulären Druckes +dp/dt in mmHg/s vor Ischämiebeginn und über die Dauer der Reperfusion (A) für unbehandelte Kontrollherzen (I/R, weiß) sowie für die mit  $10 \mu\text{M}$  Trapidil perfundierten Herzen (I/R + TPD; schwarz). Diagramm B zeigt den signifikanten Anstieg der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit +dp/dt zu Versuchsende bei  $t = 105$  Minuten unter Perfusion mit Trapidil gegenüber den Kontrollen (\* $p < 0,05$ ). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## Relaxationsgeschwindigkeit

Die Veränderungen in der Relaxationsgeschwindigkeit über die Versuchsdauer verhielten sich analog zur Kontraktionsgeschwindigkeit. Ischämie/Reperfusion führte zu einer starken Verringerung von  $-dp/dt$  am Versuchsende. In Übereinstimmung mit den Veränderungen der Kontraktionsgeschwindigkeit führte die Perfusion mit Trapidil zu einer weitgehenden Aufhebung dieser Ischämie-induzierten Funktionsstörung ( $-1458 \pm 172$  mmHg/s vs.  $-1982 \pm 356$  mmHg/s)(Abbildung 3-5,  $p < 0,05$ ).

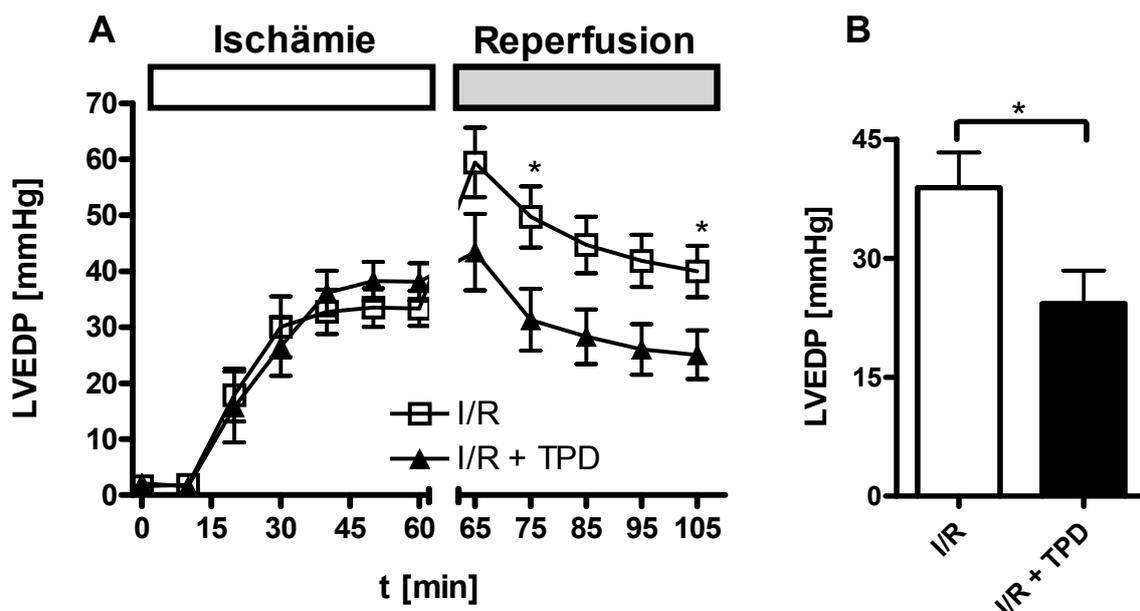


### Abbildung 3-5 Einfluss von Trapidil auf die maximale Relaxationsgeschwindigkeit

Dargestellt die maximale Relaxationsgeschwindigkeit  $-dP/dt$  in mmHg/s vor der Ischämie und während der Reperfusion (A) für unbehandelte Kontrollherzen (I/R, weiß) sowie für die mit  $10 \mu\text{M}$  Trapidil perfundierten Herzen (I/R + TPD, schwarz). Diagramm B zeigt den signifikanten Anstieg der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit  $-dP/dt$  zu Versuchsende bei  $t = 105$  Minuten unter Perfusion mit Trapidil gegenüber den Kontrollen ( $*p < 0,05$ ). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### Linksventrikulärer enddiastolischer Druck

Als weiterer funktioneller Parameter wurde der LVEDP gemessen. Die Kontraktur der Herzen während der Ischämie/Reperfusion ist ein Indikator für steigende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im Zytosol. Die Herzen beider Versuchsgruppen zeigten über die Dauer der Ischämie einen zunehmenden Anstieg des LVEDP bis auf 35 bis 40 mmHg vor Beginn der Reperfusion. Die Wiederherstellung der Perfusion führte zu einem raschen Anstieg des LVEDP, der allerdings in den Trapidil perfundierten Herzen deutlich geringer ausfiel ( $59 \pm 6$  mmHg vs.  $43 \pm 7$  mmHg, n.s.). Auch die LVEDP-Erhöhung im Verlauf der Reperfusion wurde durch Trapidil deutlich herabgesetzt und war am Versuchsende signifikant geringer als in der Kontrollgruppe (Abbildung 3-6,  $p < 0,05$ ).

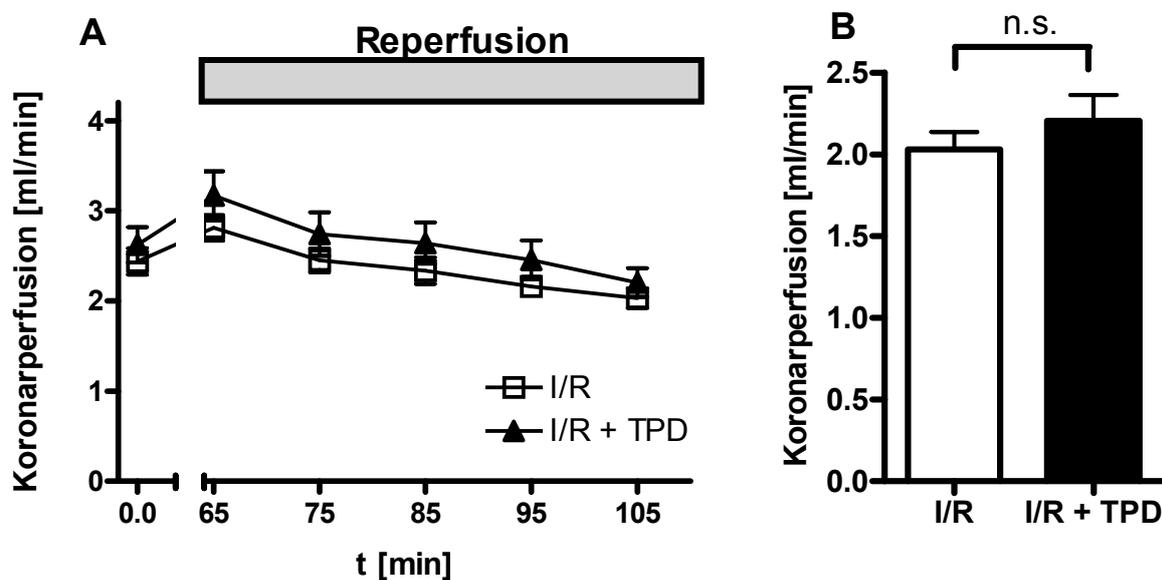


#### Abbildung 3-6 Einfluss von Trapidil auf den linksventrikulären enddiastolischen Druck

Dargestellt ist der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) in mmHg während der Ischämie und über die Dauer der Reperfusion (A) für unbehandelte Kontrollherzen (I/R, weiß) sowie für die mit  $10 \mu\text{M}$  Trapidil perfundierten Herzen (I/R + TPD, schwarz). Diagramm B zeigt den signifikanten Abfall des LVEDP zu Versuchsende bei  $t = 105$  Minuten unter Perfusion mit Trapidil gegenüber den unbehandelten Kontrollen ( $*p < 0,05$ ). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## Koronarperfusion

Trapidil hatte zu keinem Zeitpunkt einen Effekt auf die Koronarperfusion der Herzen. Sowohl im nicht ischämischen Herzen zu Versuchsbeginn als auch im Verlauf der Reperfusion war der Koronarfluss durch Trapidil nicht verändert ( $2,0 \pm 0,1$  vs.  $2,2 \pm 0,1$  ml/min,  $p > 0,05$ ). Eine unveränderte Koronarperfusion schließt auch eine PDE-Hemmung durch Trapidil in der verwendeten Konzentration aus (Abbildung 3-7).



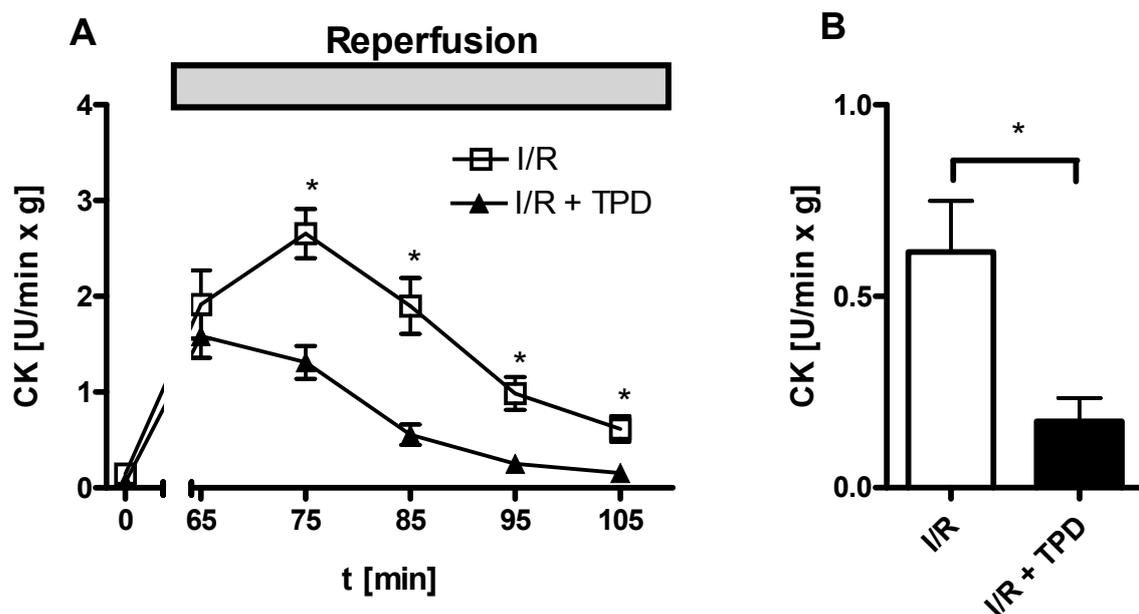
### Abbildung 3-7 Einfluss von Trapidil auf die Koronarperfusion

Dargestellt ist die Koronarperfusion in ml/min vor Ischämiebeginn und während der Reperfusion (A) für unbehandelte Kontrollherzen (I/R, weiß) sowie für die mit 10 µM Trapidil perfundierten Herzen (I/R + TPD; schwarz). Diagramm B zeigt die Koronarperfusion bei t = 105 Minuten unter Perfusion mit Trapidil gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Es gab keine signifikanten Unterschiede (n.s.).

### 3.3.2 Biochemische Parameter

#### Kreatinkinase

Als biochemischer Indikator für eine strukturelle Schädigung durch Ischämie wurde die Freisetzung von Kreatinkinase in das Perfusat bestimmt. Entsprechend der Verbesserung der funktionellen Parameter durch Trapidil nach Ischämie/Reperfusion konnte ein verbesserter Strukturerhalt auch auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden. Trapidil senkte die Freisetzung von Kreatinkinase in das Effluat in der Reperfusion signifikant vom Zeitpunkt  $t = 75$  Minuten bis zum Versuchsende bei  $t = 105$  Minuten (Abbildung 3-8). Am Versuchsende war die CK-Freisetzung in den Trapidil behandelten Herzen signifikant reduziert ( $0,62 \pm 0,10$  vs  $0,17 \pm 0,10$  U/min\*g,  $p < 0,05$ ).



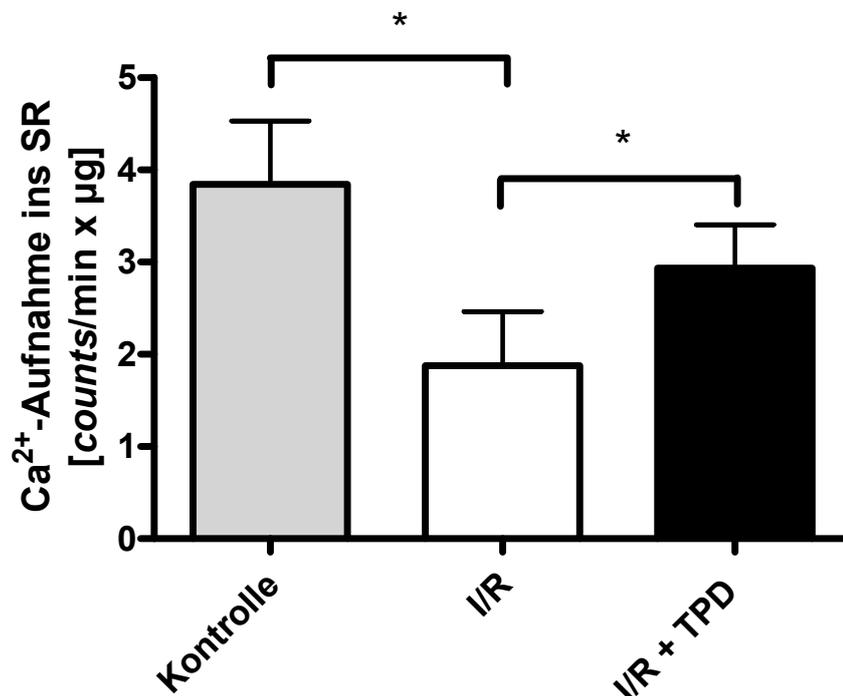
**Abbildung 3-8 Einfluss von Trapidil auf die Freisetzung von Kreatinkinase in das Perfusat**

Dargestellt ist die Kreatinkinase-Freisetzung in das Perfusat vor Ischämiebeginn und während der Reperfusion (A) für unbehandelte Kontrollherzen (I/R, weiß) sowie für die mit  $10 \mu\text{M}$  Trapidil perfundierten Herzen (I/R + TPD, schwarz). Diagramm B zeigt den signifikanten Abfall der freigesetzten Kreatinkinase-Aktivität zu Versuchsende bei  $t = 105$  Minuten unter Perfusion mit Trapidil gegenüber den unbehandelten Kontrollen ( $*p < 0,05$ ). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme in das SR

Im Weiteren sollte der Mechanismus der protektiven Wirkung von Trapidil auf das ischämische Myokard anhand der Messung der Ca<sup>2+</sup>-Kinetik untersucht werden. Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Überladung des Zytosols mit Ca<sup>2+</sup>, da ein Anstieg in der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration über verschiedene Prozesse maßgeblich an der durch Ischämie/Reperfusion ausgelösten Schädigung beteiligt ist bzw. diese auslöst.

Ischämie/Reperfusion reduzierte die Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme in das SR von  $3,8 \pm 0,7$  auf  $1,9 \pm 0,6$  counts/min x µg, d.h. um 50 %. Eine Perfusion der Herzen mit Trapidil verhinderte dies weitgehend und erhöhte die Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme in das SR wieder auf  $2,9 \pm 0,5$  counts/min x µg ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 3-9). Allerdings war dieser Wert immer noch signifikant geringer als bei nicht-ischämischen Kontrollen.



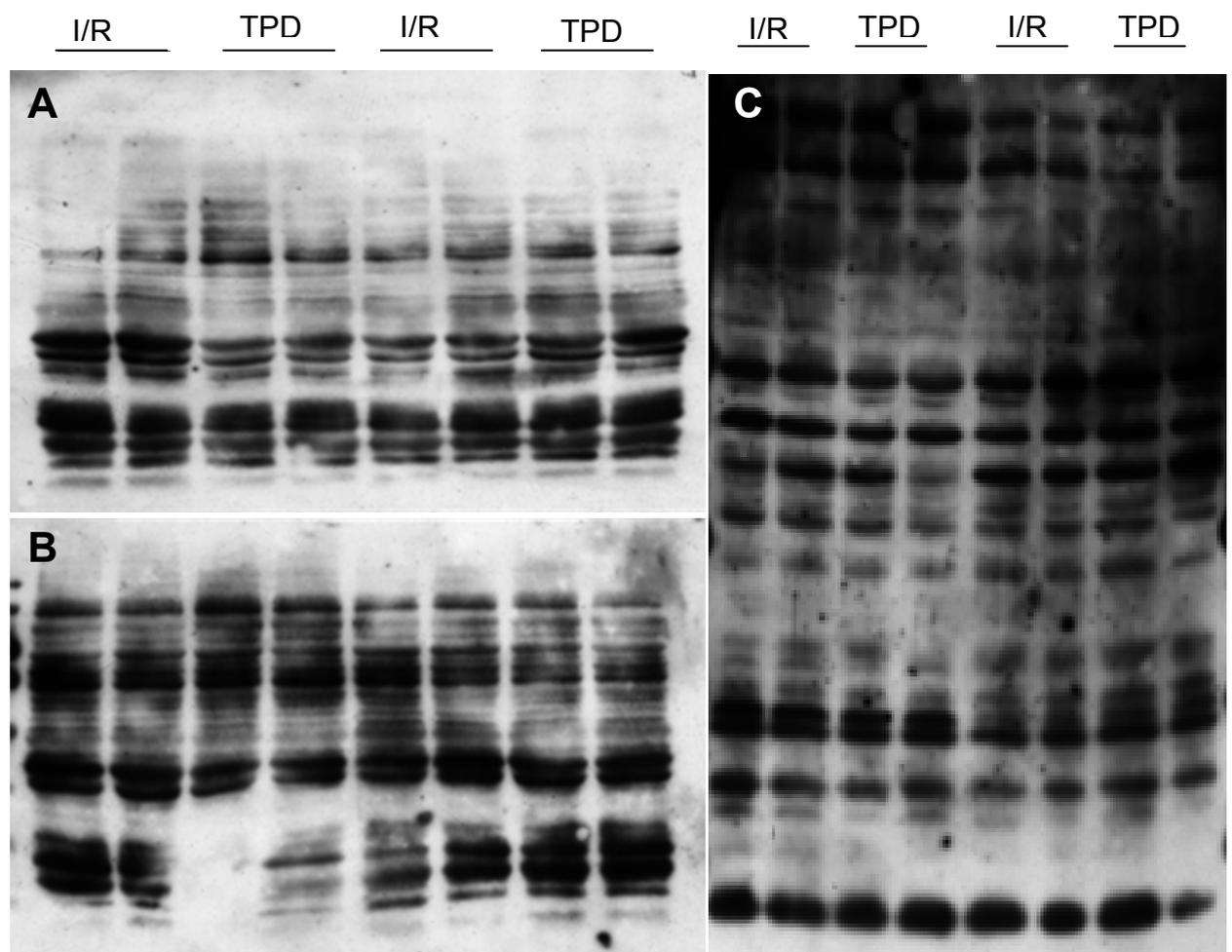
**Abbildung 3-9 Einfluss von Trapidil auf die Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme in das SR**

Dargestellt ist Geschwindigkeit der Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme in counts/min x µg in das SR von nicht ischämischen Herzen (Kontrolle) und Herzen nach Ischämie/Reperfusion (I/R) ohne und mit Zusatz von Trapidil (I/R + TPD). Die Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme wurde unter Verwendung von <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> bestimmt und auf die Proteinmenge normiert (n = 5, \* $p < 0,05$ ). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

### 3.3.3 Tyrosinphosphorylierung

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Perfusion mit Trapidil während Ischämie/Reperfusion auch zu Veränderungen in der Proteinexpression und im Phosphorylierungsmuster der Proteine führt.

Dazu wurden zunächst Western-Blots mit Antikörpern angefertigt, die spezifisch phosphorylierte Serin- bzw. Tyrosinreste erkennen.



#### Abbildung 3-10 Einfluss von Trapidil auf die Proteinphosphorylierung nach I/R

Dargestellt sind repräsentative Western-Blots auf Phosphotyrosin und Phosphoserin mit Proteinproben nach Ischämie/Reperfusion ohne Behandlung (I/R) und nach Ischämie/Reperfusion mit 10 µM Trapidil (TPD). (A) Phosphotyrosin-WB mit 10 µg Protein pro Spur und (B) mit 20 µg Protein pro Spur. (C) Phosphoserin-WB mit einer Beladung von 10 µg Protein pro Spur. Die Abbildung zeigt je einen repräsentativen Western-Blot von fünf Experimenten mit ähnlichem Ergebnis. Pro Westernblot wurde Protein aus vier Herzen pro Versuchsgruppe aufgetragen.

In diesen Versuchen wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Bedingungen getestet. Insbesondere wurden die eingesetzten Proteinmengen und die Konzentration der eingesetzten Antikörper variiert, um eine möglichst gute Auftrennung und Detektion an Serin oder Tyrosin phosphorylierter Proteine zu erreichen.

Aufgrund des geringen Auflösungsvermögens und der Vielzahl an Tyrosin- oder Serinresten phosphorylierten Proteinen konnten trotz intensiven Bemühens mittels Western-Blot auf Phosphoserin und Phosphotyrosin keine spezifischen Veränderungen detektiert werden (Abbildung 3-10).

### 3.3.4 Phosphorylierung von PKA-Substraten

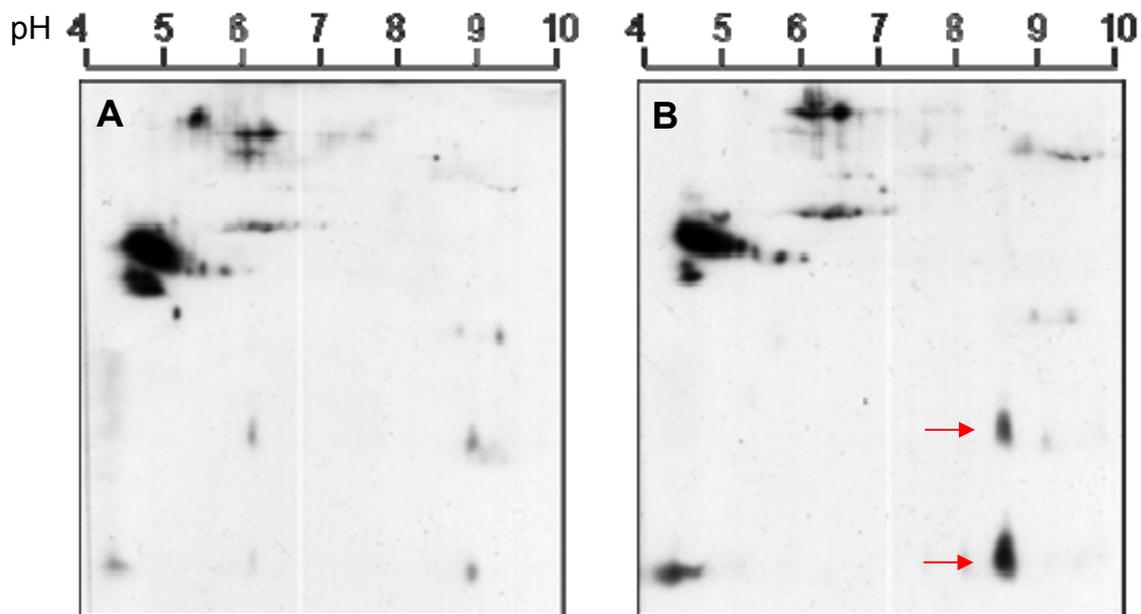
Aus vorangegangenen Arbeiten war bekannt, dass Trapidil zu einer Sensibilisierung der membranständigen PKAII gegenüber cAMP und damit letztlich zu deren Aktivierung führt. Da die Untersuchung der Proteinphosphorylierung keine Unterschiede im Phosphorylierungsmuster durch Trapidil ergab, wurde nun spezifisch die PKA-Substrat-Phosphorylierung untersucht.

Dazu wurde aus den Mäuseherzen Protein für die 2D-Elektrophorese gewonnen. Die Proteinextrakte wurden zunächst 2D-elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels Western-Blot-Analyse mit einem Antikörper, der spezifisch an Serinresten phosphorylierte PKA-Substrate detektiert, untersucht.

Die Auftrennung erfolgte in 7 cm langen Immobilisierten-pH-Gradienten (IPG)-Streifen mit einem immobilisierten pH-Gradienten von 3 – 10. Es wurden 25 µg Protein pro Streifen aufgeladen. Die Behandlung der Herzen mit Trapidil führte zu einer deutlichen Veränderung im Phosphorylierungsmuster (Abbildung 3-11). In den Trapidil-behandelten Herzen schienen zwei Spots mit annähernd identischem isoelektrischen Punkt zwischen pH 8,6 und pH 8,9 und einem Molekulargewicht von ca. 30 und 10 kDa deutlich aufreguliert zu sein. Die Identität dieser Spots konnte trotz wiederholter Versuche massenspektrometrisch nicht ermittelt werden. Dies beruht möglicherweise auf einer Überlagerung der Peptidmassen des Proteins durch die Peptide des gebundenen Antikörpers, was leider versuchstechnisch nicht zu vermeiden war.

Um trotzdem mögliche Kandidatenproteine einzugrenzen, wurde eine ausführliche Literaturrecherche durchgeführt (Übersicht in Walsh et al. 1992). Dabei wurde

speziell nach bekannten und möglichen PKA-Substraten gesucht, die ein entsprechendes Molekulargewicht und einen entsprechenden isoelektrischen Punkt aufwiesen.



**Abbildung 3-11 PKA-Substrat Western-Blot von Herzhomogenaten nach Ischämie und Reperfusion**

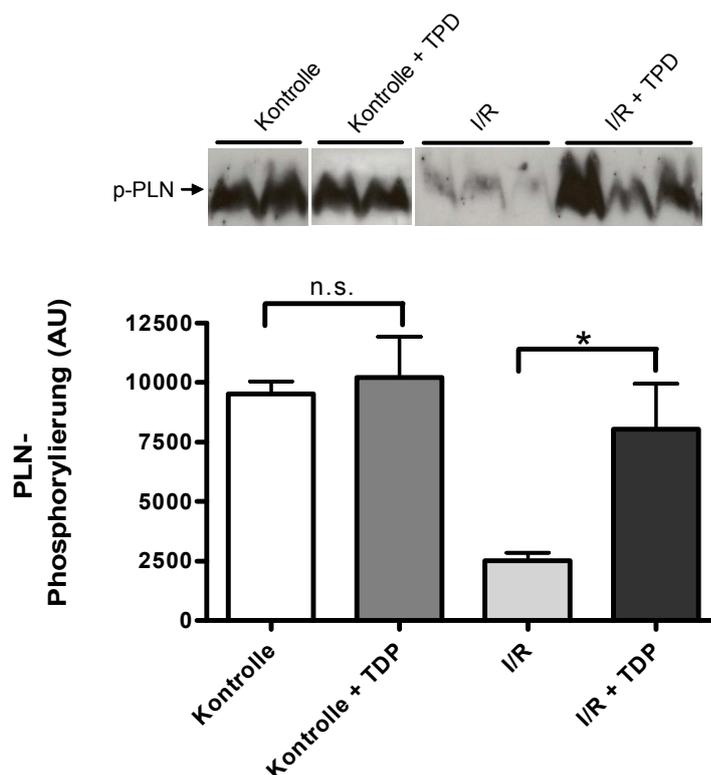
Gezeigt sind Abbildungen von PKA-Substrat Western-Blots nach der Auftrennung der Proteine in 2D-Gelen, Abbildung A zeigt den Blot eines Kontrollherzens nach Ischämie und Reperfusion, Abbildung B ein mit Trapidil perfundiertes Herz nach Ischämie und Reperfusion. Die relevanten „Spots“ die unter Trapidil ein verändertes Muster aufweisen, sind durch die Pfeile hervorgehoben. Dargestellt ist ein repräsentativer Western-Blot von drei unabhängigen Experimenten pro Gruppe.

Als mögliches Substrat ergab sich Phospholamban mit einem Molekulargewicht von 6 kDa für das Monomer und einem theoretischen isoelektrischen Punkt von 9,15 in seiner unphosphorylierten Form. Dabei ist zu berücksichtigen, dass Phospholamban in seiner phosphorylierten Form zur Bildung von Homopentameren neigt, und daher unter nicht vollständig reduzierenden und denaturierenden Bedingungen in SDS-PAGE-Gelen Mehrfachbanden mit unterschiedlichen Molekulargewichten zwischen 6 und 30 kDa zeigen kann. Aufgrund dieser Daten nahmen wir an, dass es sich bei den durch Behandlung mit Trapidil verstärkt phosphorylierten Spots um Phospholamban handeln könnte. Darüber hinaus wurde für Phospholamban in anderen Spezies bereits eine PKA-abhängige Phosphorylierung nachgewiesen (Sichelschmidt *et al.*, 2003, Szentandrassy *et al.*, 2007).

### 3.3.5 Phospholamban-Phosphorylierung am Serin 16 nach Ischämie/Reperfusion

Serin 16 ist die PKA-spezifische Phosphorylierungsstelle von Phospholamban, und daher zur Detektion von einer PKA-induzierten PLN-Phosphorylierung besonders geeignet (Drago und Colyer 1994).

Bei der Untersuchung der Phosphorylierung von Phospholamban zeigte sich, dass Trapidil in nicht-ischämischen Herzen keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von PLN hat. Ischämie/Reperfusion bewirkte den fast vollständigen Verlust der Phospholamban-Phosphorylierung. Die Perfusion der Herzen mit Trapidil führte zu einer weitgehenden Wiederherstellung der Phosphorylierung von Phospholamban nach Ischämie/Reperfusion (Abbildung 3-12,  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 3-12 Einfluss von Trapidil auf die Phosphorylierung von Phospholamban an Serin 16 nach Ischämie und Reperfusion**

Dargestellt sind repräsentative Western-Analysen mit einem Anti-Phospholamban-Antikörper, der die an Serin 16 phosphorylierte Form des Proteins detektiert, von nicht ischämischen Kontrollherzen (weiß), von mit Trapidil (TPD) perfundierten nicht ischämischen Kontrollherzen (dunkelgrau), von Herzen nach Ischämie und Reperfusion (I/R; hellgrau) und von Trapidil behandelten Herzen nach Ischämie und Reperfusion (schwarz) sowie die densitometrische Auswertung für je  $n=3$  Herzen ( $*p < 0,05$ ). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 3.3.6 Zusammenfassung 3.3

Für das isolierte, druckkonstant nach Langendorff perfundierte Mäuseherz wurde ein Ischämie/Reperfusion-Protokoll erarbeitet, das zu einer partiell reversiblen und reproduzierbaren Schädigung der Herzen führt. Das Ausmaß der Schädigung wurde sowohl funktionell über die Messung der Herzkontraktilität und ischämischen Kontraktur als auch biochemisch über die Messung der CK-Freisetzung quantifiziert. Außerdem erfolgte eine Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR sowie der Phospholamban-Phosphorylierung mittels 2D-Gelelektrophorese und Western-Blot.

Unter Kontrollbedingungen kam es zu einer signifikanten, ca. 40 bis 50 %-igen Abnahme der Kontraktilitätsparameter sowie zu einer ebenfalls signifikanten Zunahme des LVEDP und der CK-Freisetzung in das Herzperfusat. Dies ging mit einer deutlich verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR einher. Die Phospholamban-Phosphorylierung war im Western-Blot weitgehend aufgehoben.

Die Behandlung der Herzen mit Trapidil führte zu einer deutlichen Verbesserung aller Ischämieparameter. Aus den Daten der 2D-Gelelektrophorese, konnte eine Wiederherstellung der Phospholamban-Phosphorylierung durch Trapidil vermutet werden. Dies wurde durch Western-Blot bestätigt. Funktionell führte dies zu einer signifikanten Verbesserung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR.

### 3.4 Einfluss von Trapidil auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden in PLN<sup>-/-</sup>-Mäusen

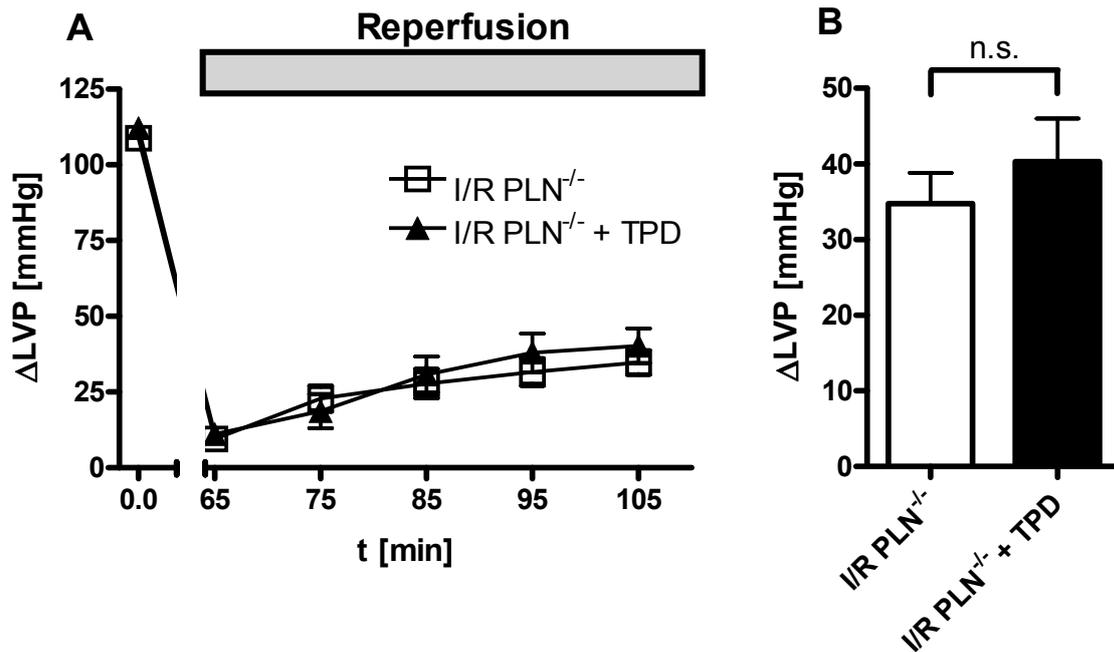
Nach der positiven Identifizierung von Phospholamban als ein zelluläres Zielprotein der Trapidil induzierten PKA-Aktivierung, wurde im Folgenden untersucht, ob die Wiederherstellung der Phosphorylierung von Phospholamban durch Trapidil bei Ischämie/Reperfusion auch für die kardioprotektiven Effekte der Substanz verantwortlich ist. Dazu wurden Langendorff-Herzen von PLN<sup>-/-</sup>-Tieren dem gleichen Versuchsprotokoll wie die Wildtyp Tiere unterzogen. Alle funktionellen Parameter waren vor Beginn der Ischämie in den Herzen aus den PLN<sup>-/-</sup>-Tieren durch Trapidil unbeeinflusst.

#### 3.4.1 Funktionelle Parameter

##### Linksventrikulär aktiv entwickelter Druck

Analog zu den Herzen aus Wildtyp (WT)-Tieren führt eine 60-minütige Ischämie mit nachfolgender Reperfusion in den PLN<sup>-/-</sup>-Tieren zu einer starken Reduktion des  $\Delta$ LVP. Am Ende des Versuchsprotokolls erreichten die Herzen nur ca. 35 % der Kontraktionskraft im Vergleich zu Versuchsbeginn.

Im Gegensatz zu den Herzen der Wildtyp-Tiere führte die Perfusion mit Trapidil in den PLN<sup>-/-</sup>-Tieren nicht zu einer signifikanten Steigerung des linksventrikulär aktiv entwickelten Drucks. Der  $\Delta$ LVP war durch den Zusatz von Trapidil über die gesamte Versuchsdauer unverändert. Im Vergleich zu den Herzen aus WT-Tieren zeigen die Herzen aus den transgenen Tieren einen etwas höheren  $\Delta$ LVP vor Ischämiebeginn der jedoch keine Signifikanz erreichte ( $99 \pm 5$  mmHg vs.  $109 \pm 4$  mmHg) (Abbildung 3-13).

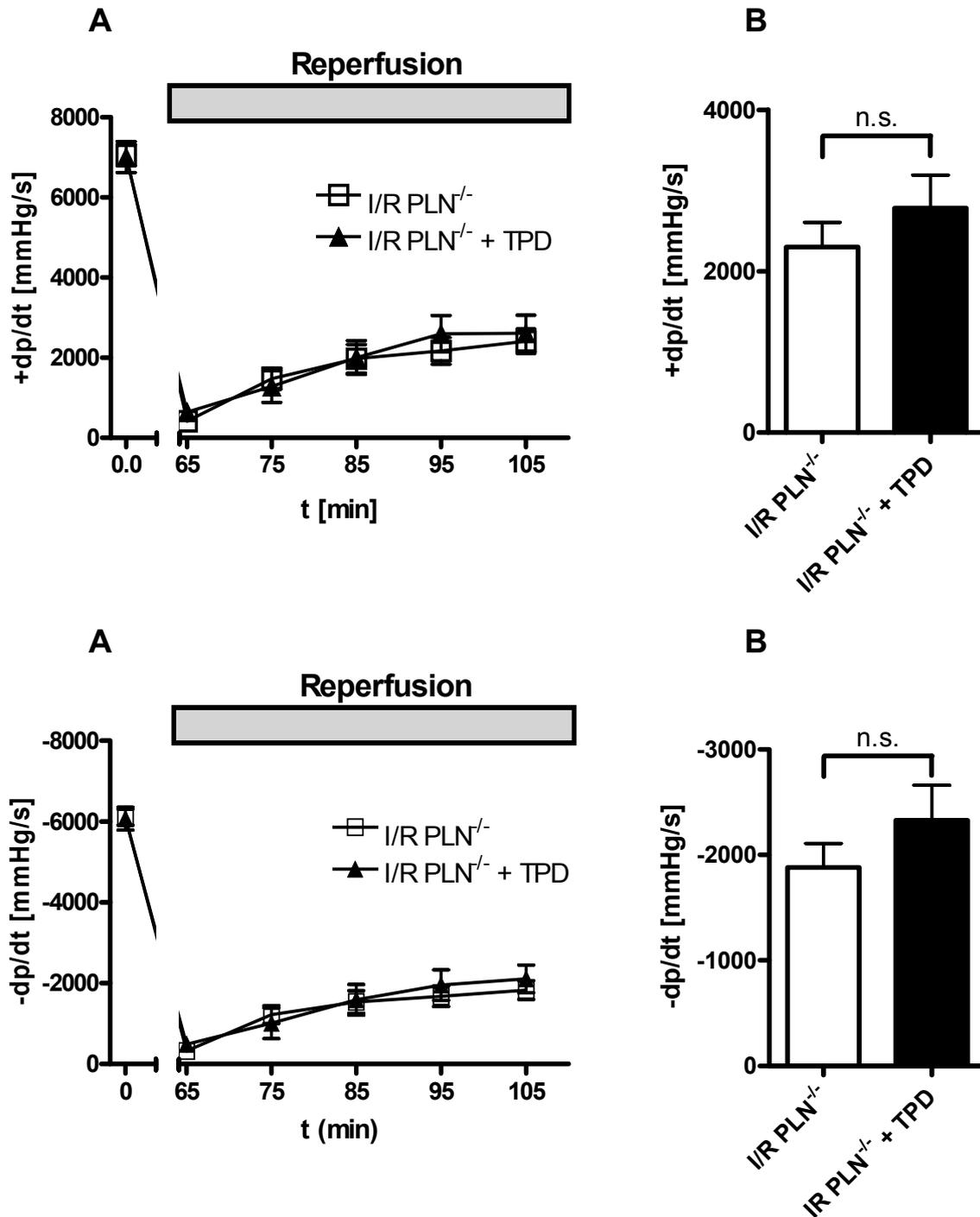


### Abbildung 3-13 Einfluss von Trepidil auf den $\Delta$ LVP in PLN-defizienten Mäusen

Dargestellt ist der aktiv entwickelte linksventrikuläre Druck  $\Delta$ LVP vor Ischämiebeginn und über die Dauer der Reperfusion (A) für unbehandelte PLN<sup>-/-</sup>-Herzen (I/R PLN<sup>-/-</sup>, weiß) sowie für die mit 10  $\mu$ M Trepidil perfundierten PLN<sup>-/-</sup>-Herzen (I/R PLN<sup>-/-</sup> + TPD; schwarz). Diagramm B zeigt  $\Delta$ LVP zu Versuchsende bei t = 105 Minuten unter Perfusion mit Trepidil gegenüber den Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Es gab keine signifikante Veränderung im linksventrikulär aktiv entwickelten Druck zwischen den Versuchsgruppen (n.s.).

### Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit

Ebenso zeigte sich über den gesamten Versuchsverlauf keine signifikante Beeinflussung der Parameter +dp/dt und -dp/dt. Sowohl die Kontraktions- als auch die Relaxationsgeschwindigkeit waren in der Reperfusionsphase durch die ischämische Schädigung stark vermindert. Beide Parameter zeigten in der Reperfusion keine signifikante Verbesserung durch die Behandlung der Herzen mit Trepidil (Abbildung 3-14).

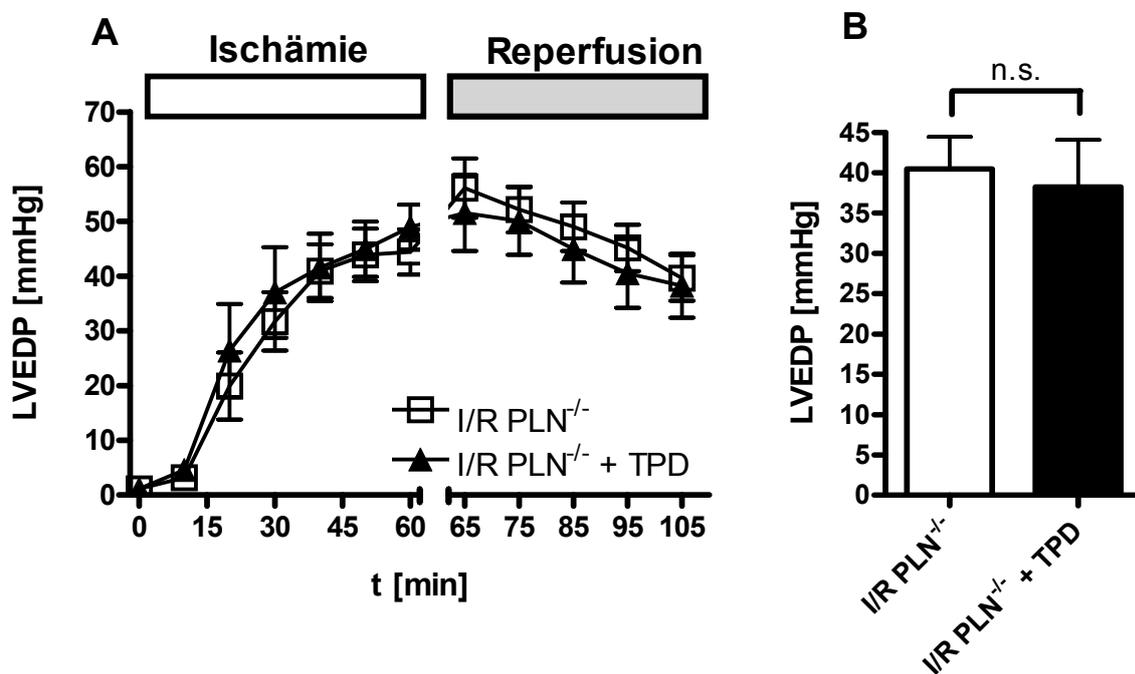


**Abbildung 3-14 Einfluss von Trapidil auf die maximale Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit in PLN-defizienten Mäusen**

Dargestellt ist die maximale Kontraktions- (+dp/dt) und Relaxationsgeschwindigkeit (-dp/dt) in mmHg/s vor Ischämiebeginn und über die Dauer der Reperfusion (A) für PLN<sup>-/-</sup>-Herzen nach I/R (I/R PLN<sup>-/-</sup>, weiß) sowie für die mit 10 µM Trapidil perfundierten PLN<sup>-/-</sup>-Herzen (I/R PLN<sup>-/-</sup> + TPD, schwarz). Diagramm B zeigt jeweils die maximale Kontraktions- und die Relaxationsgeschwindigkeit zu Versuchsende bei t = 105 Minuten. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. Die Veränderungen waren nicht signifikant (n.s.).

### Linksventrikulärer enddiastolischer Druck

Die ischämische Kontraktur war in den mit Trapidil perfundierten PLN<sup>-/-</sup>-Herzen im Vergleich zu unbehandelten PLN<sup>-/-</sup>-Kontrollherzen nicht signifikant verändert. Die Herzen beider Versuchsgruppen zeigen über die Dauer der Ischämie einen stetigen Anstieg des LVEDP bis auf etwa 45 mmHg vor Beginn der Reperfusion. Für den LVEDP ergab sich im Gegensatz zu den Wildtyp-Herzen auch im Verlauf der Reperfusion keine signifikante Verbesserung (Reduktion) der Kontraktur durch Trapidil (Abbildung 3-15).

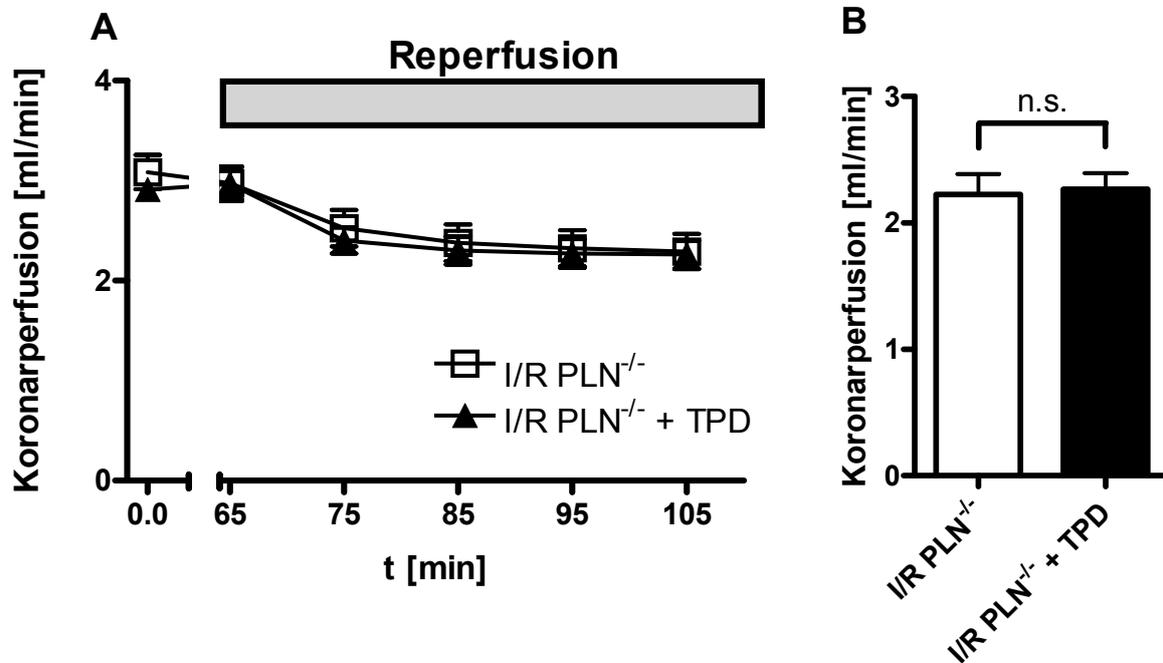


**Abbildung 3-15 Einfluss von Trapidil auf den linksventrikulären enddiastolischen Druck in PLN-defizienten Mäusen**

Dargestellt ist der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) in mmHg während der Dauer der Ischämie und über die Dauer der Reperfusion (A) für unbehandelte PLN<sup>-/-</sup>-Kontrollherzen (I/R PLN<sup>-/-</sup>; weiß) sowie für die mit 10 µM Trapidil perfundierten PLN<sup>-/-</sup>-Herzen (I/R PLN<sup>-/-</sup> + TPD; schwarz). Diagramm B zeigt den LVEDP zu Versuchsende bei t = 105 Minuten unter Perfusion mit Trapidil gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. Es gab keine signifikante Veränderung im linksventrikulären enddiastolischen Druck zwischen den Versuchsgruppen (n.s.).

## Koronarperfusion

Trapidil zeigte über die gesamte Versuchsdauer keine Wirkung auf den Koronarfluss der transgenen Tiere (Abbildung 3-16).



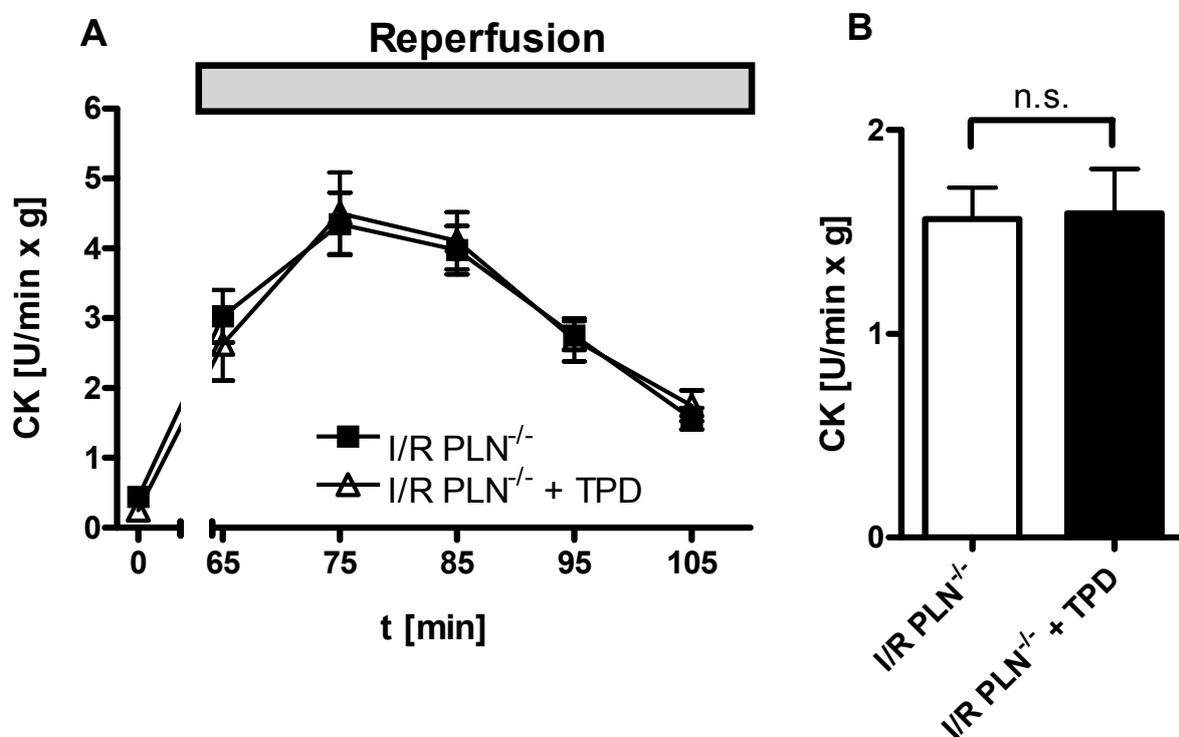
### Abbildung 3-16 Einfluss von Trapidil auf die Koronarperfusion in PLN-defizienten Mäusen

Dargestellt ist die Koronarperfusion in ml/min vor Ischämiebeginn und während der Reperfusion (A) für unbehandelte PLN<sup>-/-</sup>-Kontrollherzen (I/R PLN<sup>-/-</sup>, weiß) sowie für die mit 10 µM Trapidil perfundierten PLN<sup>-/-</sup>-Herzen (I/R PLN<sup>-/-</sup> + TPD; schwarz). Diagramm B zeigt die Koronarperfusion bei t=105 min unter Perfusion mit Trapidil gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. Die Veränderungen waren nicht signifikant (n.s.).

### 3.4.2 Biochemische Parameter

#### Kreatinkinase

Analog zu den funktionellen Parametern zeigte sich in den mit Trapidil perfundierten Herzen aus PLN<sup>-/-</sup>-Tieren auch keine Veränderung der Kreatinkinase-Freisetzung. Die in das Perfusat freigesetzte CK-Aktivität war für die mit Trapidil behandelten und die unbehandelten Herzen über den gesamten Versuchsverlauf gleich (Abbildung 3-17).

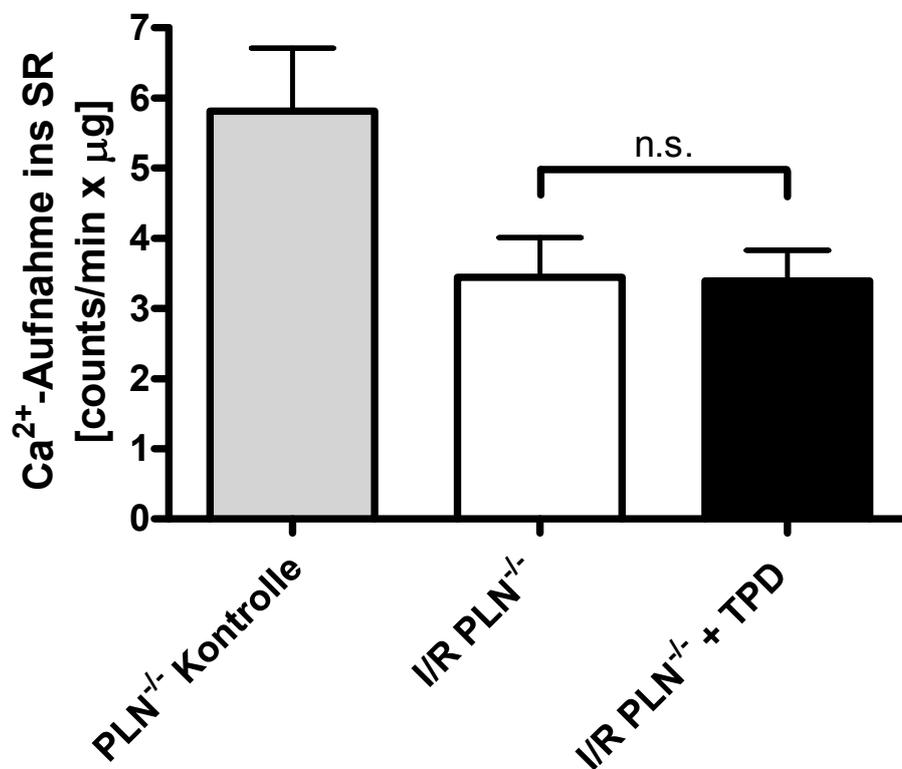


**Abbildung 3-17 Einfluss von Trapidil auf die Freisetzung von Kreatinkinase in das Perfusat in PLN-defizienten Mäusen**

Dargestellt ist die Kreatinkinase-Freisetzung in das Perfusat vor Ischämiebeginn und während der Reperfusion (A) für unbehandelte Kontrollherzen (I/R PLN<sup>-/-</sup>, weiß) sowie für die mit 10 µM Trapidil perfundierten Herzen (I/R PLN<sup>-/-</sup> + TPD; schwarz). Diagramm B zeigt die freigesetzte Kreatinkinase Aktivität zu Versuchsende bei t = 105 Minuten unter Perfusion mit Trapidil gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. Es gab keine signifikante Veränderung zwischen den Versuchsgruppen (n.s.).

## Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme

Ischämie/Reperfusion führte in den Herzen der PLN<sup>-/-</sup>-Tiere zu einer signifikanten Verringerung der Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme in das SR von  $5,8 \pm 0,9$  auf  $3,4 \pm 0,6$  counts/min x  $\mu\text{g}$  ( $p < 0,05$ ). Diese Abnahme lag im gleichen Bereich wie bei den WT-Tieren ( $3,8 \pm 0,7$  counts/min x  $\mu\text{g}$ ). Im Gegensatz zu den WT-Tieren wurde aber bei den PLN<sup>-/-</sup>-Herzen die Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme durch Trapidil nicht verbessert und blieb bei  $3,4 \pm 0,4$  counts/min x  $\mu\text{g}$  (Abbildung 3-18,  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 3-18 Einfluss von Trapidil auf die Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme in das SR von PLN-defizienten Mäusen**

Dargestellt ist die Geschwindigkeit der Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme in counts/min x  $\mu\text{g}$  in das SR von nicht ischämischen PLN<sup>-/-</sup>-Herzen (Kontrolle) und Herzen nach Ischämie/Reperfusion (I/R PLN<sup>-/-</sup>) ohne und mit Zusatz von Trapidil (I/R PLN<sup>-/-</sup> + TPD). Die Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme wurde unter Verwendung von <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> bestimmt und auf die Proteinmenge normiert ( $n = 5$ ). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Veränderungen waren nicht signifikant (n.s.).

### 3.4.3 Zusammenfassung 3.4

Langendorff-Herzen von PLN<sup>-/-</sup>-Tieren wurden dem gleichen Ischämie-/Reperfusionprotokoll unterzogen wie Herzen von WT-Mäusen. Die Herzen von PLN<sup>-/-</sup>-Tieren zeigten dabei einen den WT-Tieren vergleichbaren Grad der Myokardschädigung. Dies betraf alle gemessenen funktionellen und biochemischen Parameter sowie die Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme in das SR.

Im Gegensatz zu Herzen von WT-Tieren zeigte Trapidil bei den Herzen von PLN<sup>-/-</sup>-Tieren keinerlei Verbesserungen der funktionellen und biochemischen Parameter und normalisierte auch nicht die Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme in das SR.

Diese Befunde beweisen eine essentielle Rolle von Phospholamban für die kardioprotektiven Trapidilwirkungen an diesem Modell.

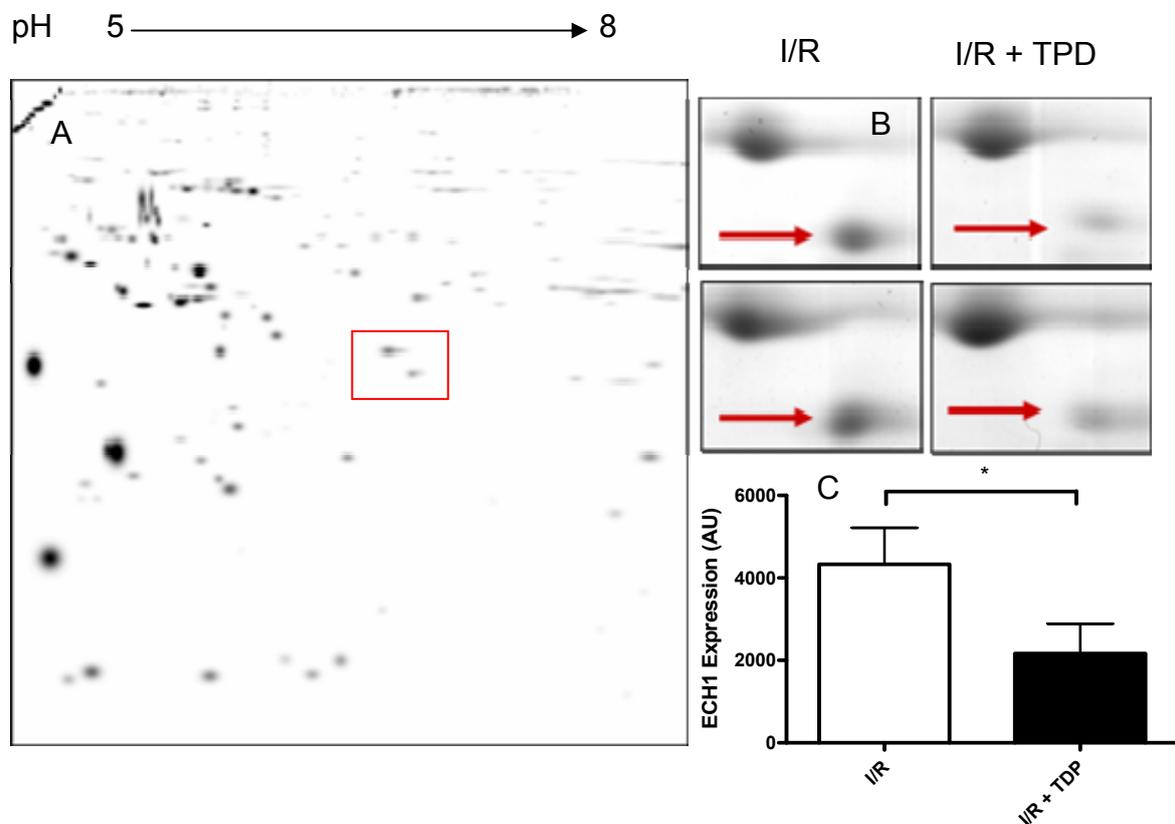
### 3.5 Einfluss von Trapidil auf die Expression von ECH1

Die Western-Blot-Daten haben gezeigt, dass sich das Phosphorylierungsmuster kardialer Proteine nach Trapidilbehandlung bzw. Trapidil-induzierter PKA-Aktivierung ändert. Diese Untersuchungen waren naturgemäß auf solche Proteine beschränkt, für die spezifische Antikörper verfügbar sind. Damit erlaubt dieses Verfahren keine Aussagen über solche Proteine für die keine Antikörper verfügbar sind. Andererseits ist aber davon auszugehen, dass die PKA aufgrund ihrer breiten Substratspezifität wesentlich mehr Proteine phosphoryliert als derzeit mittels Western-Blot erfasst werden können (Walsh *et al.*, 1992).

Zur Lösung dieses Problems wurde daher im Folgenden versucht, möglichst viele Proteine parallel zu untersuchen. Dazu erfolgte eine Auftrennung durch 2D-Gelelektrophorese mit der Absicht der späteren Identifizierung differentiell exprimierter Proteine.

#### 3.5.1 Expression von ECH1 auf Proteinebene

Der Vergleich von Herzen nach I/R mit und ohne Zusatz von Trapidil zum Perfusat ergab nach computergestützter Auswertung der 2D-Gele 2 Spots, die um mindestens den Faktor zwei verändert erschienen. Bei einer optischen Analyse wurde einer der Spots von der weiteren Analyse ausgenommen, da dieser im streifigen Randbereich der Gele lag und nicht genau quantifiziert werden konnte. Der zweite Spot lag im sauber aufgetrennten mittleren Bereich der Gele und zeigte in den mit Trapidil perfundierten Herzen eine signifikant verringerte Intensität, die auch optisch bestätigt werden konnte. Dieser Spot wurde mit Hilfe der Massenspektrometrie analysiert und in vier unterschiedlichen Gelen als ECH1 (*Mus musculus enoyl coenzyme A hydratase 1, peroxisomal*) identifiziert. Eines von vier Originalergebnissen einer Identifizierung mittels Massenspektrometrie ist in *Tabelle 3-1* dargestellt.



### Abbildung 3-19 Einfluss von Trapidil auf die Proteinexpression nach I/R

Dargestellt ist das Ergebnis einer 2D-Elektrophorese nach Ischämie/Reperfusion. Es wurden je drei Proben aus Herzen nach I/R und I/R mit 10  $\mu$ M Trapidil 2D elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Dargestellt ist ein mit Hilfe der computergestützten Auswertungssoftware erstelltes Gelbild (A), welches nur Spots darstellt, die in allen sechs Gelen eindeutig zugeordnet werden konnten. Vergrößerung des gekennzeichneten Bereiches in Gelen aus Herzen nach I/R (I/R) und Trapidil perfundierten Herzen nach I/R (I/R + TPD) (B) sowie eine densitometrische Auswertung der Spots (C). Dargestellt sind zwei von drei unabhängigen Experimenten mit ähnlichem Ergebnis.

**Tabelle 3-1** Beispielergebnis einer massenspektrometrischen Identifizierung des regulierten Spots aus der 2D-Gelelektrophorese

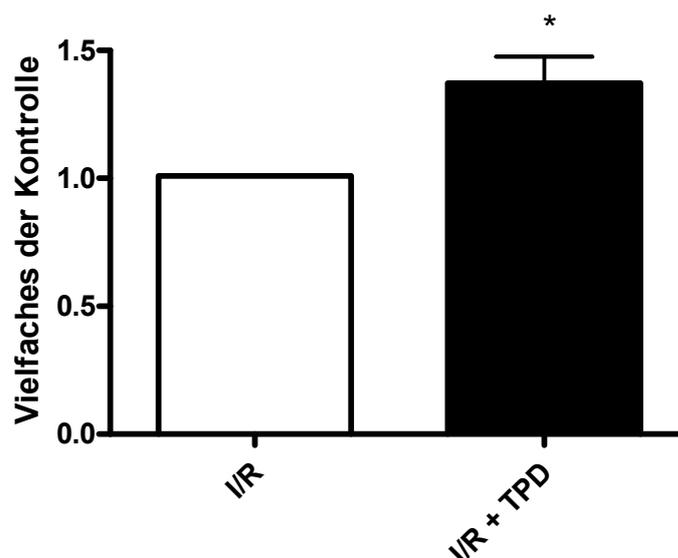
7,1 file:		Tilo60130_7_1.RAW					
<b>ECH1_MOUSE    Mass: 36095    Score: 2563    Queries matched: 86</b>							
(O35459) Delta3,5-delta2,4-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor (EC 5.3.3.-)							
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect
349	682.28	681.28	681.37	-0.09	0	27	0.17
397	787.37	786.36	786.46	-0.10	0	40	0.012
452	419.26	836.51	836.46	0.04	0	42	0.0066
570	439.51	877.01	877.50	-0.50	0	55	0.00038
808	526.80	1051.59	1051.50	0.09	0	26	0.22
1160	419.65	1255.94	1255.68	0.26	1	28	0.14
1633	711.03	1420.05	1419.65	0.40	0	58	0.00014
1960	763.96	1525.91	1525.68	0.23	0	100	7e-09
2253	795.97	1589.93	1589.77	0.16	0	74	3.7e-06
2392	827.68	1653.35	1653.77	-0.42	1	65	2.3e-05
2563	862.85	1723.69	1723.85	-0.16	0	108	1.5e-09
2642	874.41	1746.81	1746.93	-0.12	0	79	1.1e-06
3841	781.29	2340.85	2341.16	-0.31	1	77	1.2e-06
Nominal mass ( $M_r$ ): <b>36095</b> ; Calculated pI value: <b>7.60</b>							
Variable modifications: Carbamidomethyl (C),Oxidation (M)							
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P							
Sequence Coverage: <b>36%</b>							

### 3.5.2 Expression von ECH1 auf Genebene

In der 2D-Elektrophorese lässt sich meist nicht feststellen über welchen Mechanismus es zu einer Veränderung der Protein-Spots kommt. So können eine veränderte Transkription, Translation und Degradation zu Veränderungen im Proteinmuster führen. Darüber hinaus können posttranslationale Modifikationen das Spotmuster verändern.

Um zu überprüfen, ob eine veränderte Transkription für die Herabregulation der ECH1 auf Proteinebene verantwortlich ist, wurde aus den Herzen am Ende des Ischämie-/Reperusionsprotokolls RNA aufgereinigt und eine RT-qPCR durchgeführt. Entgegen dem Ergebnis der 2D-Gelelektrophorese, die eine verminderte Expression von ECH1 in den mit Trapidil behandelten Herzen zeigte, ist die Expression auf Genebene in den Trapidil-behandelten Tieren minimal von 1,0 (Referenzwert) auf 1,3 erhöht.

Die Veränderung der ECH1-Expression auf Proteinebene in den Herzen der mit Trapidil perfundierten Mäusen ist demnach nicht mit einer verringerten Transkription zu erklären (Abbildung 3-20).



**Abbildung 3-20 Genexpression von ECH1 in der *Realtime*-qPCR**

Relative Expression von ECH1 nach I/R in unbehandelten Herzen (I/R, weiß) und in Herzen die mit 10  $\mu$ M Trapidil (I/R + TPD, schwarz) behandelt wurden (\* $p < 0,05$ ). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 3.5.3 Zusammenfassung 3.5

Zur weiteren Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Trapidil wurde die Veränderung der Proteinexpression vor und nach Trapidilbehandlung mittels 2D-Gelelektrophorese untersucht.

Dabei zeigten die 2D-Gele nur wenige klare Veränderungen, was möglicherweise auf der geringen Empfindlichkeit der Färbemethode beruht. Auffällig war die verminderte Expression eines Proteins durch die Perfusion mit Trapidil, das massenspektrometrisch als *Enoyl Coenzym A Hydratase 1* (ECH1) identifiziert werden konnte. Mittels Realtime-qPCR konnte eine transkriptionelle Herabregulation des Proteins ausgeschlossen werden.

Da ECH1 ein Enzym der  $\beta$ -Oxidation freier Fettsäuren ist, ist ein Zusammenhang mit der für Trapidil experimentell beschriebenen Verbesserung des Energiestatus des ischämischen Herzens möglich aber bisher nicht bewiesen.

## 4 Diskussion

In den siebziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurde die medikamentöse Koronardilatation als ein erfolgreiches Konzept zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit angesehen. Hierzu gehörte auch die Behandlung der akuten myokardialen Ischämie, d. h. des Herzinfarktes. Mehrere Substanzen wurden mit der Maßgabe einer möglichst selektiven Koronardilatation entwickelt und als antianginöse Arzneimittel zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit klinisch eingeführt. Hierzu gehörten Carbochromen, Dipyridamol, Oxyfedrin und andere. Auch das Triazolopyrimidin-Derivat Trepidil (Rocornal®) wurde ursprünglich als nitratähnlich wirkender koronarer Vasodilatator entwickelt und in die Therapie eingeführt (Dittrich *et al.*, 1971, Füller *et al.*, 1971). Im Gegensatz zu den meisten anderen „Koronardilatoren“ findet Trepidil allerdings auch heute noch Anwendung in der Therapie der koronaren Herzkrankheit und ist für diese Indikation in mehreren Ländern, einschließlich Deutschlands zugelassen und gehört, z. B. in Japan, zu den meistverordneten Koronartherapeutika.

Die klinische Wirksamkeit der Substanz bei Patienten mit *Angina Pectoris* wurde in mehreren Studien nachgewiesen (Raubach *et al.*, 1997, Yasue *et al.*, 1999, Hirayama *et al.*, 2003). Yasue *et al.* (1999) zeigten in der *Japanese Antiplatelet Myocardial Infarction Study* (JAMIS-Studie), dass Trepidil die Häufigkeit kardiovaskulärer Ereignisse nach einem akuten Myokardinfarkt signifikant senkt. Hirayama *et al.* (2003) fanden in einer randomisierten japanischen Multicenter-Studie bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit eine Abnahme kardiovaskulärer Ereignisse, einschließlich Herzinfarkt und Schlaganfall, von über 3 % und Meinertz und Lehmacher berichteten für Trepidil bei Patienten mit chronisch ischämischer Herzkrankheit eine Äquieffektivität zu Isosorbiddinitrat (Meinertz und Lehmacher 2006). In der STARC (Studio Trepidil versus Aspirina nella Restenosi coronarica) II Studie senkte Trepidil signifikant die Restenoserate sechs Monate nach Ballonangioplastie (Maresta *et al.*, 2005). Vergleichbar positive Ergebnisse einer oralen Langzeittherapie bei Hochrisikopatienten wurden für die anderen „Koronardilatoren“ nicht gefunden und auch die klassischen Vertreter aus der Gruppe der Nitratre reduzieren lediglich die Symptome einer *Angina Pectoris*, führen aber nicht zu einer Verbesserung der Langzeitprognose der koronaren

Herzkrankheit. Damit stellt sich die Frage, ob tatsächlich eine Koronardilatation, falls vorhanden, die klinische Wirksamkeit von Trapidil erklärt oder ob nicht andere Mechanismen dafür verantwortlich sind.

Kardioprotektive Eigenschaften von Trapidil sind aus Tierversuchen bekannt. So führte eine konstante intravenöse Infusion von 3 mg/kg Trapidil bei Hunden über eine Dauer von 60 Minuten, beginnend 60 Minuten nach Erzeugung einer Myokardischämie (Anlegen einer Koronarligatur), zu einer Reduktion der Infarktgröße um 69 % sowie zu einer signifikanten Hemmung des postischämischen CK-Anstiegs und der Ischämie-assoziierten ST-Streckenänderungen im EKG. Als Erklärung wurde eine Verbesserung der endomyokardialen Durchblutung im ischämischen Bezirk angenommen (Yamaguchi *et al.*, 1983). Allerdings blieb offen, ob und welche der zahlreichen weiteren postulierten Trapidilwirkungen, insbesondere eine mögliche Interaktion mit Thrombozyten, deren Thromboxansynthese oder andere Effekte (Block *et al.*, 1983) dazu beitragen.

Eine Beteiligung von Blutkomponenten konnte allerdings ausgeschlossen werden, nachdem gezeigt wurde, dass Trapidil auch am isolierten, blutfrei perfundierten Herzen, kardioprotektiv wirkt. In reperfundierten ischämischen Langendorff-Herzen des Kaninchens führte eine Reduktion der Koronarperfusion auf 5 % des Kontrollwertes für zwei Stunden mit anschließender einstündiger Reperfusion zu einem infarkt-ähnlichen Bild mit drastischer Zunahme des linksventrikulären Enddiastolendruckes (Kontraktur). Darüber hinaus kam es zu einer massiven CK-Freisetzung in das Koronareffluat als Zeichen einer Myokardzellschädigung mit Zerstörung der Zellmembran. Zusatz von Trapidil (10 µM) zum Perfusionsmedium verhinderte diese ischämischen Schädigungen weitgehend ohne den koronaren Gefäßwiderstand der Herzen zu verändern (Schrör *et al.*, 1998b). Dies belegt, dass die kardioprotektive Wirkung von Trapidil nicht auf eine Koronardilatation, etwa im Zusammenhang mit einer Hemmung von Phosphodiesterasen, zurückzuführen ist.

Trotz der zweifelsfrei nachgewiesenen kardioprotektiven Wirksamkeit der Substanz, vor allem bei Myokardischämie, ist der genaue Wirkungsmechanismus bis heute unbekannt. Eine – auch in Analogie zu den o.g. „Koronardilatatoren“ vermutete – (nichtselektive) Phosphodiesterasehemmung ist zwar sicher vorhanden, allerdings

für die therapeutische Effektivität der Substanz irrelevant, da die hierfür erforderlichen Konzentrationen von ca. 150 - 300  $\mu\text{M}$  *in vivo* nicht annähernd erreicht werden. Auch würde eine Hemmung cAMP-abbauender Phosphodiesterasen, z.B. PDE3 und PDE4, wahrscheinlich keine kardioprotektive sondern eher blutdrucksenkende Effekte besitzen und, wie z.B. im Falle des Dipyridamols eher zu einem koronaren „steal“ Phänomen führen und als Nebenwirkung Kopfschmerzen verursachen. Beides tritt unter Behandlung mit Trapidil nicht ein. Dies veranlasste eine gezielte Suche nach subzellulären Wirkungsmechanismen, die bei therapielevanten Dosen – hier angesetzt mit 10  $\mu\text{M}$  (Harder *et al.*, 1996) – nachweisbar sind. Diese Arbeiten führten zunächst zur Entdeckung der direkten Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) durch Trapidil (Bönisch *et al.*, 1998). In Folgearbeiten konnte gezeigt werden, dass eine besondere membranständige PKA-Isoform, die PKA II (Osinski und Schrör 1999), Zielstruktur von Trapidil ist. Dies wurde mit Untersuchungen des rekombinanten Enzyms eindeutig belegt (Sichelschmidt *et al.*, 2003). Letztgenannte Untersuchungen zeigten am Modell des ischämisch reperfundierten Kaninchenherzens auch, dass eine selektive PKA-Aktivierung durch Trapidil kardioprotektiv wirkt und dies möglicherweise mit der PKA-induzierten Phospholambanphosphorylierung in Zusammenhang steht (Sichelschmidt *et al.*, 2003). Ein kausaler Zusammenhang konnte allerdings nicht nachgewiesen werden und war eher zweifelhaft angesichts der zahlreichen Substrate, die PKA-abhängig phosphoryliert werden können (Walsh *et al.*, 1992). Besonders bemerkenswert im Zusammenhang mit den antiischämischen Wirkungen von Trapidil ist, dass es den ischämieinduzierten Abfall des myokardialen Gehalts von ATP und Kreatinphosphat signifikant reduziert (Yamaguchi *et al.*, 1983). Es führt dabei nicht nur zu einer Verbesserung der Energiebilanz des ischämischen Herzens, sondern steigert auch das (energieabhängige) Phosphorylierungspotential. Es blieb jedoch unklar, ob sich eine möglicherweise veränderte Phospholambanphosphorylierung auf die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im ischämisch-reperfundierten Herzen auswirkt.

Die Untersuchung dieser Fragestellungen war Gegenstand der hier vorgelegten Arbeit. Im Gegensatz zu früheren Arbeiten wurde hier die Maus als Versuchsobjekt verwendet, nachdem in Vorversuchen die Eignung dieser Spezies als Ischämiemodell gezeigt worden war. Ein entsprechendes Versuchsprotokoll einer –

im Gegensatz zum Kaninchen – „*no-flow*“ Ischämie wurde erarbeitet, bei dem der ischämische Myokardschaden unter Reperfusion partiell reversibel war. Nur für die Spezies Maus ist eine breite Auswahl genmodulierter Tiere vorhanden, einschließlich Phospholamban-gendefizienter Mäuse, die für den Nachweis einer Kausalkette erforderlich waren.

In dieser Arbeit konnte erstmals ein kausaler Zusammenhang zwischen Phospholamban und Myokardischämie als Ursache der kardioprotektiven Wirkung von Trapidil nachgewiesen werden. Damit liegt eine (Re)Phosphorylierung von Phospholamban über die erhöhte PKA-Aktivität unter Einfluss von Trapidil nahe. Allerdings sind damit drei Fragen noch unbeantwortet: (i) Ist Phospholamban das einzige (therapierelevante) Substrat der Trapidil-induzierten Aktivierung der PKA oder existieren noch weitere? (ii) Was bedeutet eine wiederhergestellte Phospholambanphosphorylierung funktionell, d. h. insbesondere im Zusammenhang mit der Regulation der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration? (iii) Gibt es zusätzliche zelluläre Wirkorte, die für die anti-ischämische Wirkung von Trapidil relevant sind?

#### 4.1 Substrate der Trepidil-induzierten PKA-Aktivierung – Phospholamban

Phospholamban ist ein bekannter Regulator innerhalb der Signalkette, welche die zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel innerhalb der Zelle reguliert. Der Abfall der Phospholambanphosphorylierung verbunden mit gestörter  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase ist ein typisches Merkmal des myokardialen Ischämieschadens (Schoutsen *et al.*, 1989). Valverde und Mitarbeiter (2006) konnten an einem transgenen Mausmodell einen protektiven Effekt der Phosphorylierung von PLN bei Ischämie/Reperfusion zeigen. In den hier verwendeten Mäusen wurden die beiden Phosphorylierungsstellen im PLN (Ser16 und Thr17) durch gezielte Mutagenese gegen die Aminosäure Arginin ausgetauscht. Diese PLN-Mutante, in der keine Phosphorylierung des Proteins möglich ist, zeigte im Vergleich zu den Tieren mit WT-PLN eine signifikant verschlechterte Kontraktilität nach I/R (Valverde *et al.*, 2006). An diesem Modell wird eine protektive Wirkung durch die Phosphorylierung an Thr17 über eine  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-aktivierte PKA angenommen (Mattiuzzi *et al.*, 2005). Sowohl eine Phosphorylierung an Thr17 als auch an Ser16 erhöhen die (reduzierte) SERCA2a-Aktivität und damit auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR. Damit wäre auch durch eine gesteigerte cAMP/PKA-medierte Phosphorylierung an Ser16 eine protektive Wirkung zu erwarten. Diese Hypothese einer funktionell bedeutsamen Erhöhung der PKA-abhängigen Phosphorylierung wurde durch die dargestellten Ergebnisse an WT-Mäusen bestätigt.

Schon frühere Untersuchungen in unserem Labor hatten eine Aktivierung der cAMP-abhängigen PKA II im Zusammenhang mit antiproliferativen Effekten von Trepidil gezeigt (Bönisch *et al.*, 1998, Osinski und Schrör 1999). Dies wurde später durch andere Autoren bestätigt (Ishikura *et al.*, 2005). Interessanterweise schienen auch die kardioprotektiven Wirkungen von Trepidil über eine membranständige PKA II vermittelt zu werden (Sichelschmidt *et al.*, 2003). Dabei konnte auch gezeigt werden, dass Trepidil nicht zu einer direkten, cAMP-unabhängigen, Aktivierung der PKA führt, sondern deren Empfindlichkeit gegenüber cAMP erhöht, d.h. eine „sensibilisierende“ Wirkung besitzt (Sichelschmidt *et al.*, 2003). Damit stellte sich die Frage, welche Substrate dieser PKA durch Trepidil bei Ischämie/Reperfusion phosphoryliert werden, die als Träger der kardioprotektiven Wirkung in Frage kommen. Hierbei ist

zu berücksichtigen, dass die PKA eine extrem breite Substratspezifität besitzt und an einer Vielzahl regulatorischer Prozesse beteiligt ist (Tabelle 4-1) (Walsh *et al.*, 1992). Daher ist die Vorhersage eines spezifischen Phosphorylierungssubstrates schwierig.

**Tabelle 4-1 Ausgewählte Substrate der Proteinkinase A**

Aufgelistet sind Proteine, für die eine Phosphorylierung durch die PKA *in vitro* nachgewiesen und *in vivo* bestätigt werden konnte (Walsh *et al.*, 1992).

<b>PKA-Substrate</b>
Muscle glycogen synthase: site 1a
Muscle glycogen synthase: site 1b
Muscle glycogen synthase: site 2
Liver glycogen synthase: site 2
Muscle phosphorylase kinase, a subunit
Muscle phosphorylase kinase, p subunit
Protein phosphatase-I-glycogen binding subunit
Protein phosphatase inhibitor-I
Liver 6-phosphofructo-2-kinase
Fructose 2,6-bisphosphatase
Phosphofructo-I-kinase
Fructose-1,6-bisphosphatase
Pig liver pyruvate kinase
Rat adipocyte hormone sensitive lipase
Acetyl coenzyme A carboxylase: site 2
Acetyl coenzyme A carboxylase: site 1
ATP citrate lyase
Liver phenylalanine hydroxylase
Liver tyrosine hydroxylase
Rat brain CAMP regulatory element binding protein
Regulatory subunit type-2 CAMP-dependent protein kinase
Rabbit heart troponin I
Chicken gizzard myosin light chain kinase
Canine cardiac phospholamban
Rat liver ribosomal protein 56
Bovine brain dopamine-regulated phosphoprotein
Rat brain synapsin
Acetylcholine receptor: 6 subunit
Acetylcholine receptor: $\gamma$ subunit
Pro-atrial natriuretic peptide
Neurofilament 70 kD subunit (NF-L)

Wie erwartet, erwies sich zunächst eine globale Darstellung serin-/tyrosin-phosphorylierter Proteine in SDS-PAGE Gelen als unzureichend und bestätigte lediglich das Vorhandensein zahlreicher Proteinsubstrate, die an Serin-/Tyrosinresten phosphoryliert werden können. Zur genaueren Analyse wurden daher die Proteine 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend im Western-Blot hinsichtlich einer veränderten Phosphorylierung der PKA-Substrate untersucht. Hierbei wurde ein

Antikörper verwendet, der spezifisch das häufigste Phosphorylierungsmotiv der PKA erkennt. Ausreichend für eine Phosphorylierung durch die PKA sind dabei Argininreste in Position -2 und -3 zu einem zugänglichen Serinrest (Pearson und Kemp 1991, Walsh *et al.*, 1992).

Im Ergebnis waren nur zwei Spots bei den mit Trapidil behandelten Herzen signifikant verändert (Abbildung 3-11) und in mehreren Western-Blots gut reproduzierbar. Sie sind wahrscheinlich mit der phosphorylierten Form von Phospholamban identisch. Hierfür sprechen das Molekulargewicht von ca. 10 und 30 kDa und ein apparenter isoelektrischer Punkt von pH 8,5 – 8,8. Dabei ist zu berücksichtigen, dass natives Phospholamban in seiner phosphorylierten Form zur Bildung von Homopentameren neigt. Bei nicht vollständig reduzierenden und denaturierenden Bedingungen treten in SDS-PAGE-Gelen daher oft Mehrfachbanden mit apparenten Molekulargewichten zwischen 6 und 30 kDa auf (Boateng *et al.*, 1997).

Leider konnte die Identität dieser Spots trotz wiederholter Versuche massenspektrometrisch nicht aufgeklärt werden. Dies ist möglicherweise durch die starke Überlagerung der Peptidmassen des eigentlichen Proteins durch die gebundenen Antikörper zu erklären.

Dieses Ergebnis ist aufgrund der Vielzahl der durch die PKA phosphorylierten Proteine überraschend. Möglicherweise kann eine scheinbar weitgehend selektive Phosphorylierung von Phospholamban durch die starke Kompartimentierung des PKA-Signals innerhalb der Zelle erklärt werden (Dodge-Kafka *et al.*, 2006, Zaccolo 2006).

Phospholamban ist eines der entscheidenden Biomoleküle, das durch die Myokardischämie verändert wird und dessen Phosphorylierung in engem Zusammenhang mit dem Ischämieschaden steht. Voraussetzung dafür ist allerdings eine Ischämiedauer von 50 bis 60 Minuten, die bei den hier durchgeführten Versuchen bestand. Kürzere Ischämiephasen, d. h. weniger als 15 Minuten, führen dagegen bei Mäusen nicht zum Verlust der PLN-Phosphorylierung (Said *et al.*, 2003).

Aus früheren Untersuchungen am isolierten Kaninchenherzen war bereits bekannt, dass Trapidil am reperfundierten ischämischen Herzen zu einer weitgehenden Wiederherstellung der Phospholamban-Phosphorylierung führt (Sichelschmidt *et al.*, 2003). Dies stimmt gut mit den o. g. elektrophoretischen Daten überein und erhält zusätzliches Gewicht durch das Fehlen einer kardioprotektiven Wirkung bei phospholambandefizienten Mäusen. Trotzdem stellt sich die Frage, warum – unabhängig von methodisch bedingten Veränderungen – die Trapidil-mediierte PKA-Aktivierung offenbar spezifisch ist. Dazu sind zunächst einige Ausführungen zur Regulation der PKA-Substrat-Phosphorylierung erforderlich.

Die räumliche und zeitliche Kontrolle der PKA-Substrat-Phosphorylierung wird durch eine Bindung der PKA an so genannte A-Kinase-Ankerproteine (AKAPs) erreicht, die zu einer unterschiedlichen zellulären Lokalisation der verschiedenen PKA-Isoformen zusammen mit den jeweiligen Substraten führt (Carr *et al.*, 1991, Fink *et al.*, 2001, Tasken und Aandahl 2004, Wong und Scott 2004). Erst vor kurzem konnten Lygren und Mitarbeiter in Kardiomyozyten der Ratte einen Komplex aus der PKA(RII $\alpha$ ), AKAP18 $\delta$ , Phospholamban und der SERCA2a nachweisen, der zu einer SR-spezifischen PKA-Aktivität führt und über diese membranassoziierte Regulation der Phospholamban-Phosphorylierung die Wiederaufnahme von Ca<sup>2+</sup> in das SR steuert (Lygren *et al.*, 2007). Eine Kompartimentierung der PKA in verschiedene, unterschiedlich regulierte zelluläre PKA-Domänen mit einer spezifisch lokalen Regulation wurde auch in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte gefunden (Zaccolo und Pozzan 2002). In Kardiomyozyten des Frosches wurde eine lokale Aktivierung von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen am SR durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation der PKA nachgewiesen (Jurevicius und Fischmeister 1996). Alle diese Befunde sprechen für eine lokale Regulation der PKA-Aktivität bzw. der nachgeschalteten Phosphorylierungsprozesse als mögliche Erklärung der Trapidilwirkung. Hinzu kommt, dass im Mäuseherz offenbar nur die regulatorische Untereinheit RII $\alpha$  vorhanden ist (Sichelschmidt *et al.*, 2003). Daher kann mit einer Kopplung dieser PKA-Aktivität an das SR über Bindung von AKAP18 $\delta$ , die spezifische Phosphorylierung von nur wenigen Proteinen trotz breiter Substratspezifität des Enzyms erklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei Verwendung phosphospezifischer Antikörper gegen Phospholamban eine signifikante Verringerung der PKA-spezifischen

Phospholamban-Phosphorylierung am Ser16 in den WT-Herzen am Ende der Reperfusion nachgewiesen. Dieser Befund stimmt mit früheren Untersuchungen am Kaninchenherzen (Sichelschmidt *et al.*, 2003) und auch mit Arbeiten anderer Autoren zu dieser Fragestellung überein. Bei Rattenherzen führte eine 20-minütige Ischämie mit anschließender Reperfusion zu einem transienten Anstieg der PLN-Phosphorylierung am Ser16 während der Ischämie. Allerdings sank diese Phosphorylierung sofort mit Beginn der Reperfusion unter Kontrollwert-Niveau ab. In wieweit eine  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase, welche PLN am Threonin17 phosphoryliert (s. unten), die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung kompensieren kann, ist offen (Vittone *et al.*, 2002). In einer weiteren Arbeit an Rattenherzen zeigte sich ein ähnlich komplexes Bild der PLN-Phosphorylierung nach Ischämie/Reperfusion. Bei diesen Herzen, die für 30 Minuten einer globalen „no-flow“-Ischämie ausgesetzt wurden, kam es unmittelbar nach Beginn der Reperfusion zu einer transienten Steigerung der PLN-Phosphorylierung, die allerdings im weiteren Verlauf der Reperfusion weitestgehend verloren ging (Xie *et al.*, 2005). Auch in einer Untersuchung an Hunden, bei denen die linke absteigende Koronararterie *in vivo* für zehn Minuten durch Ligatur verschlossen wurde, konnte ein deutlicher Rückgang der PLN-Phosphorylierung und eine Reduktion des cAMP Gehaltes im Infarktgewebe nachgewiesen werden (Lüss *et al.*, 2000).

Auch ist aus Untersuchungen aus der Gruppe um Kranias, deren phospholamban-defizienten Mäuse hier Verwendung fanden, bekannt, dass Phospholamban eine entscheidende Determinante der Myokardfunktion unter physiologischen und pathologischen Bedingungen ist (Luo *et al.*, 1994, Mattiazzi *et al.*, 2005, Mundina-Weilenmann *et al.*, 2005, Vangheluwe *et al.*, 2006).

Damit ist Phospholamban als ein entscheidendes Substrat der Trapidil-induzierten PKA-Aktivierung gesichert, ebenso wie die Wiederherstellung der Phospholambanphosphorylierung als entscheidender Wirkungsmechanismus von Trapidil, der naturgemäß bei PLN-defizienten Mäusen fehlt. Offen ist allerdings die Frage, ob Phospholamban das einzige therapierelevante Protein der Trapidilwirkung ist. In diesem Zusammenhang ist außer der breiten Substratspezifität der PKA auch auf die in glatten Gefäßmuskelzellen gezeigte Raf-Kinase-Aktivierung durch Trapidil hinzuweisen (Bönisch *et al.*, 1998).

## 4.2 Weitere Veränderungen in der Proteinexpression – ECH1

Bei den Untersuchungen zu generellen Veränderungen des Proteinexpressionsmusters (Proteom) durch Trapidil am ischämisch reperfundierten Herzen wurde gefunden, dass die Substanz die Proteinexpression von ECH1 (*Mus musculus enoyl coenzyme A hydratase 1, peroxisomal*), einem Enzym der  $\beta$ -Oxidation, nach Reperfusion des ischämischen Herzens signifikant um mehr als 50 %, senkt. Diese verminderte Enzymexpression wird nicht durch eine Veränderung der Transkription vermittelt (Abbildung 3-20). Auch in Anbetracht des kurzen Versuchsprotokolls liegt dem Verschwinden des Spots in der 2D-Elektrophorese vermutlich eher eine posttranslationale Modifikation des Proteins oder ein beschleunigter Abbau zugrunde (Abbildung 3-19). Die Abnahme von ECH1 lässt einen Zusammenhang mit dem Energiestoffwechsel des Herzens vermuten, z. B. eine Interaktion mit der  $\beta$ -Oxidation freier Fettsäuren, die das entscheidende Substrat für den myokardialen Energiestoffwechsel sind (Salem *et al.*, 2002, Lopaschuk 2004). Allerdings liegen bislang nur sehr wenige Daten über die Funktion dieses Enzyms vor. So ergab eine Datenbankrecherche (PubMed, Medline, Dezember 2007) lediglich acht Eintragungen zu diesem Enzym.

Am ischämischen Herzen kommt es zu einer Akkumulation freier Fettsäuren aufgrund einer gestörten Metabolisierung, die möglicherweise im Zusammenhang mit dem Sauerstoffmangel steht (Neely und Feuvray 1981, van der Vusse und Stam 1987). In isolierten Mauserzen war die Palmitat-Oxidation in der Reperfusion signifikant gesteigert und die Herzleistung sowie die oxidative ATP-Produktion signifikant gesenkt (Aasum *et al.*, 2003). Eine Senkung der Fettsäureoxidation in der Reperfusion zugunsten einer gesteigerten Glukoseverwertung könnte zu einer verbesserten Herzarbeit beitragen (Lopaschuk und Spafford 1990, Schonekess *et al.*, 1995a, Schonekess *et al.*, 1995b). Weitere Arbeiten, vorzugsweise auf der Proteomebene, sind erforderlich, um diese Hypothese zu stützen.

### 4.3 Trapidil und $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase

Die Erschlaffung des Herzmuskels in der Diastole erfordert eine schnelle Entfernung des während des Aktionspotentials eingeströmten bzw. aus den zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytosol, d. h. dem Bereich der kontraktile Myofibrillen. Der überwiegende Teil dieses  $\text{Ca}^{2+}$  wird dabei unter Vermittlung der sarkoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2a) zurück in das SR transportiert (Frank *et al.*, 2003, Tada 2003). Die Aktivität der SERCA2a wird durch Phospholamban reguliert (Tada *et al.*, 1977, James *et al.*, 1989, Luo *et al.*, 1994), wobei die Affinität von Phospholamban zur SERCA2a und damit auch deren Kontrolle des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportes in das SR über die Phosphorylierung von PLN gesteuert wird (Movsesian *et al.*, 1984, Mattiazzi *et al.*, 2005).

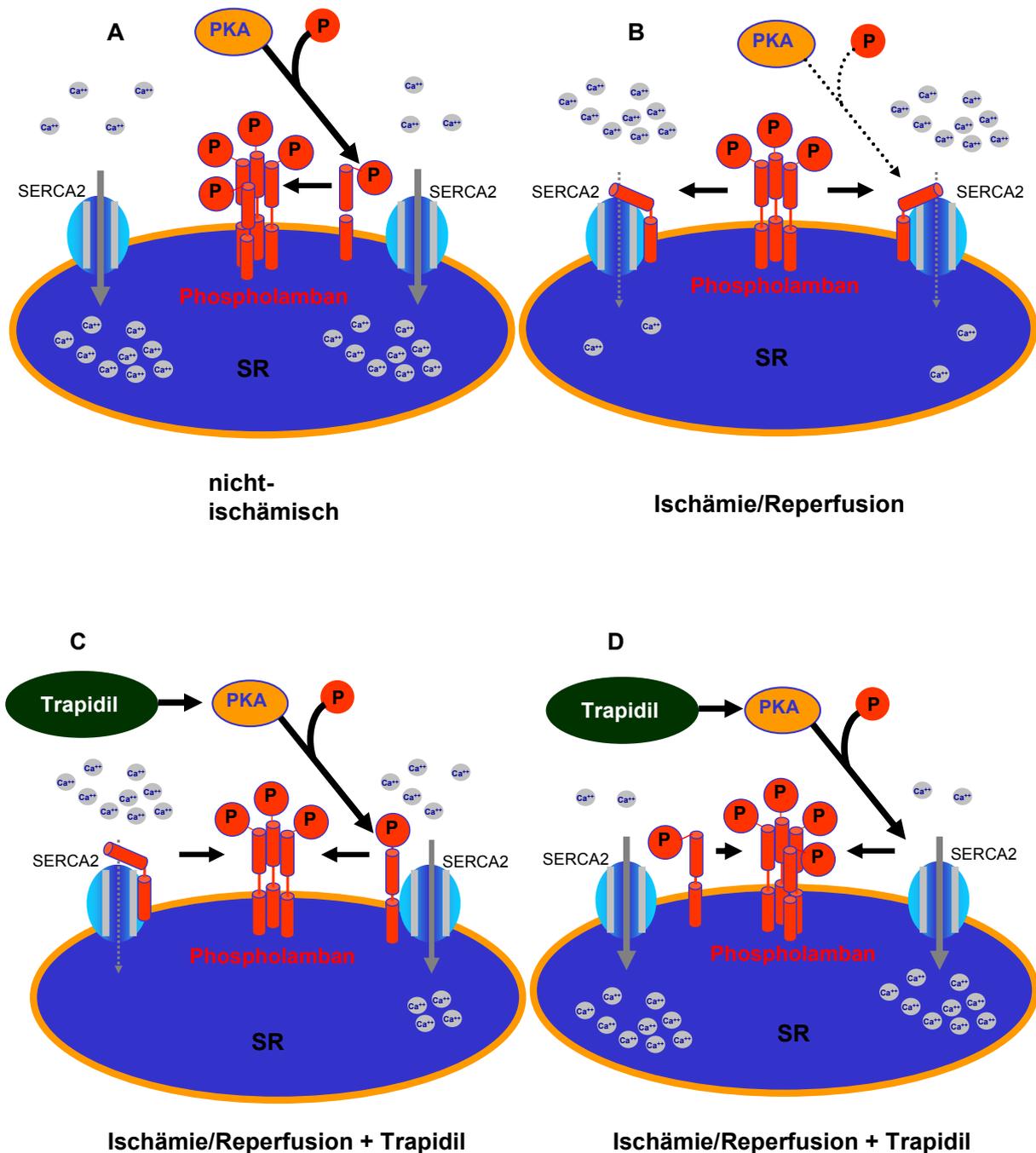
In der Literatur wurden bisher drei verschiedene Phosphorylierungsstellen von PLN beschrieben. Die Phosphorylierung an Serin 16 erfolgt vornehmlich durch die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), während die Phosphorylierung an Threonin 17 durch die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) katalysiert wird (Drago und Colyer 1994, Bartel *et al.*, 2000, Chu *et al.*, 2000, Mundina-Weilenmann *et al.*, 2005). Die Phosphorylierung von PLN an jeder dieser Positionen erhöht die SERCA2a-Aktivität und in der Folge die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR. Die dritte potentielle Phosphorylierungsstelle an Serin 10 scheint physiologisch nicht relevant zu sein (Edes und Kranias 1990).

Die zelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase ist bei Gewebeischämie massiv gestört, wobei der ischämische Gewebeschaden mit Defekten der Zellmembran (CK-Anstieg im Effluat) bei Reperfusion demaskiert wird. Die Wiederherstellung der Durchblutung bzw. der Koronarperfusion mit Pufferlösung (wie im hier gewählten experimentellen Ansatz) führt bei einer gleichzeitig gestörten  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR zu einer schnellen Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Perfusionsmedium und einem massiven Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Kardiomyozyten (Nayler 1981). Funktioneller Ausdruck dieser Überladung des Zytosols der Zellen mit  $\text{Ca}^{2+}$  und insbesondere die unzureichende Entfernung während der Diastole ist eine ischämische Kontraktur und eine maximale Stimulation des mitochondrialen Energiestoffwechsels (Ferrari *et al.*, 1993, Demaison *et al.*, 1996). Beides ist

aufgrund der reduzierten Substrat- und Sauerstoffversorgung bei Ischämie gleichermaßen deletär und letztlich entscheidend für Geschwindigkeit und Schweregrad der myokardialen Gewebeschädigung. Damit ist eine gestörte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR ein entscheidender Faktor für die myokardiale Gewebeschädigung, d. h. das Auftreten und die Größe von Zellnekrosen bei Myokardinfarkten (Schoutsen *et al.*, 1989). Daher stellt die gestörte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kinetik eine wichtige Messgröße für deren Beurteilung dar.

Wie bereits ausgeführt, wird die Geschwindigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR durch die SERCA2a und PLN als Inhibitor der SERCA2a bestimmt (Abbildung 4-1). Daher wurde die Kinetik der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR der Herzen am Ende der Reperfusion gemessen. Bei diesen Versuchen konnte erstmals eine durch PLN vermittelte Wirkung von Trapidil auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase nachgewiesen werden. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR der WT-Herzen war am Ende der Reperfusion signifikant herabgesetzt und wurde durch Trapidil weitgehend normalisiert. Naturgemäß konnte ein solcher Effekt bei PLN-defizienten Mäusen nicht gezeigt werden. Diese Wiederherstellung der PLN-Phosphorylierung durch Trapidil und die beschleunigte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR zeigte sich während der Reperfusion insbesondere in einem signifikant reduzierten LVEDP-Anstieg sowie in einer beschleunigten Relaxation der Herzen (Abbildung 3-6, Abbildung 4-1).

Kardioprotektive Effekte sind auch von anderen Substanzen bekannt, welche die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR am ischämisch reperfundierten Herzen steigern, z.B. durch einen Inhibitor von Calpain (Singh *et al.*, 2004). Durch den starken Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration werden  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Proteasen (Calpain) aktiviert, die zur Modifikation sarkoplasmatischer Proteine führen. In Rattenherzen konnte eine verbesserte PLN-Phosphorylierung an Ser16 und Thr17 nach I/R durch Perfusion der Herzen mit einem Calpain-Inhibitor nachgewiesen werden. Als Folge der verstärkten Phospholamban-Phosphorylierung war der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in das SR signifikant beschleunigt und die funktionellen Parameter der mit dem Calpain-Inhibitor behandelten Herzen waren am Ende der Reperfusion signifikant verbessert.



**Abbildung 4-1 Wirkmechanismus von Trapidil bei Ischämie/Reperfusion**

Im nicht ischämischen Myokard wird der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in das SR durch die SERCA2a über die inhibitorische Wirkung dephosphorylierter Phospholamban-Monomere kontrolliert. PKA-Aktivierung, z.B. nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation, führt zu einer PLN-Phosphorylierung und durch Aufhebung der inhibitorischen Wirkung von dephosphoryliertem Phospholamban auf die SERCA2a zu einem schnelleren  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in das SR (A).

Ischämie/Reperfusion führt zu einem Verlust der PKA-medierte PLN-Phosphorylierung und, als Folge der inhibitorischen Wirkung der PLN-Monomere auf die SERCA2a, zu einer Verringerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportes in das SR wodurch die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration stark ansteigt (B).

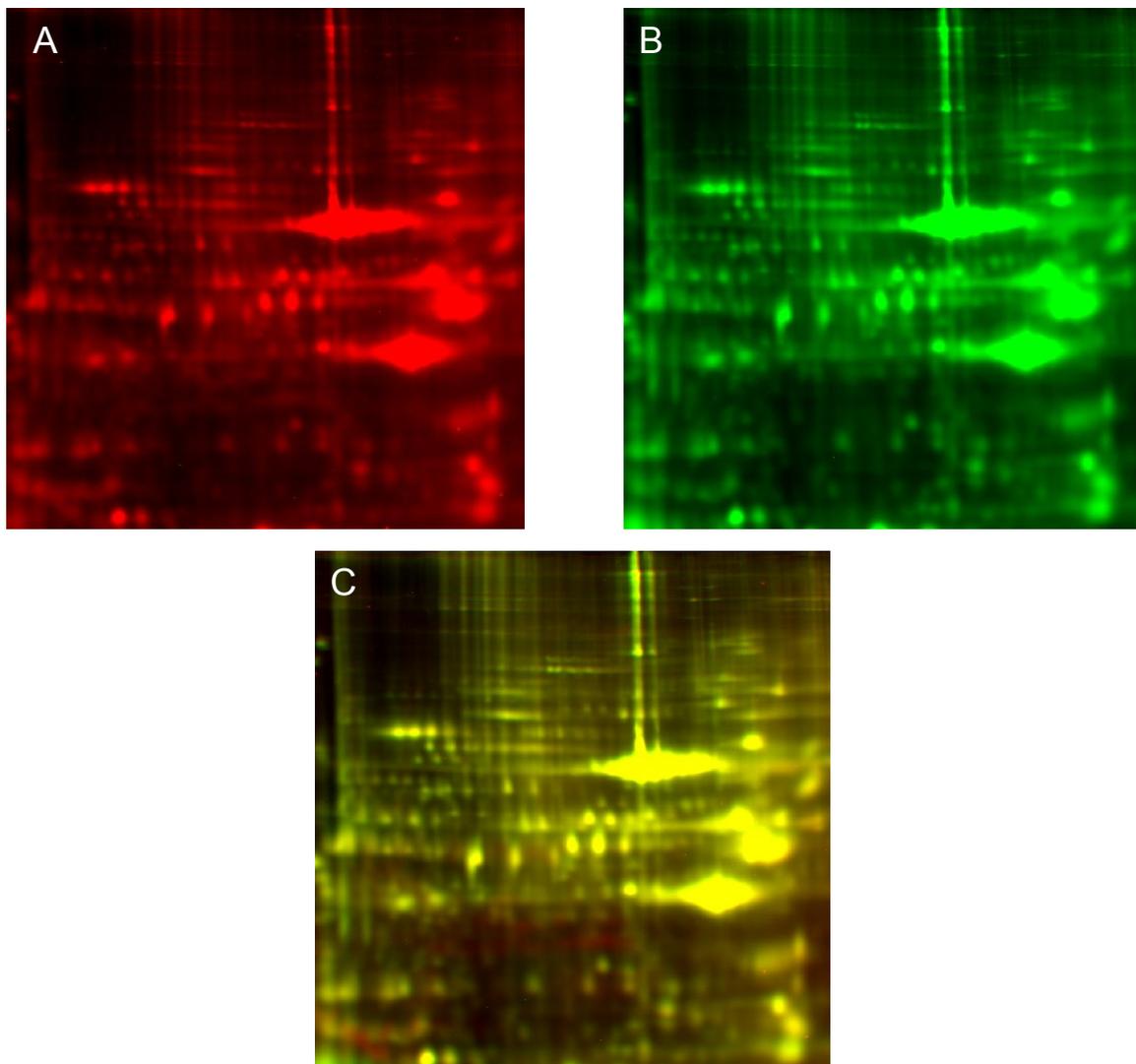
Trapidil führt durch Aktivierung der PKA zu einer Rephosphorylierung von PLN. Durch diese Phosphorylierung wird die inhibitorische PLN-Wirkung auf die SERCA2a aufgehoben (C). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in das SR wird normalisiert und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung durch I/R vermindert (D).

## 4.4 Ausblick

Die Daten der Proteinexpression der Herzen nach Ischämie/Reperfusion haben erste Anzeichen dafür ergeben, dass Trapidil über die Wiederherstellung der PLN-Phosphorylierung hinaus auch zu Veränderungen im Expressionsmuster von Proteinen führt (hier ECH1). Auch diese können zu den protektiven Wirkungen der Substanz beitragen. Um spezifische Veränderungen der Proteinexpression nachzuweisen, bedarf es einer Methode, die das Expressionsniveau vieler Proteine gleichzeitig untersuchen und dieses hinreichend genau quantifizieren kann. Eine solche Methode stellt die 2D-Gelelektrophorese dar, die auch in dieser Arbeit angewandt wurde. Ein inherentes Problem dieser Methode ist die schwierige Reproduzierbarkeit der angefertigten Gele. In einem Gel kann jeweils nur eine Probe aufgetrennt und untersucht werden. Bereits minimale Veränderungen in der Probenzusammensetzung können zu schlechter Auflösung und nicht auswertbaren Versuchen führen, da eine sichere Zuordnung der Spots zwischen verschiedenen Gelen unmöglich wird. Damit sind alternative Verfahren zur Beantwortung dieser Fragestellung erforderlich.

Eine solche Alternative zur Auftrennung der einzelnen Proben in getrennten Gelen ist die differentielle Gelelektrophorese (DIGE). Bei diesem Verfahren werden die zu vergleichenden Proben (z.B. stimuliert vs. unstimuliert) vor dem Gellauf kovalent mit verschiedenen Fluoreszenzfarben markiert. Ein mit einem dritten Fluoreszenzfarbstoff markiertes Gemisch aus beiden Proben wird als Standard verwendet. Die unterschiedlich markierten Proben werden anteilig vermischt und in einem einzigen Gel aufgetrennt. Durch die unterschiedlichen Anregungs- und Emissionswellenlängen der Farbstoffe können die einzelnen Proben mit Hilfe entsprechender Laser-Fluoreszenz-Scanner diskriminiert werden. Dieses Verfahren bietet gegenüber dem klassischen Vorgehen viele Vorteile. Durch die Verwendung nur eines Gels für die zu untersuchenden Proben entfallen die Probleme, die durch die schlechte Gel-zu-Gel-Vergleichbarkeit entstehen. Die Spotmuster der Proben sind im DIGE-Ansatz innerhalb eines Gels identisch. Darüber hinaus ist die Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen eine sehr sensitive Methode. Es können deutlich mehr Spots aufgelöst und sichtbar gemacht werden als mit den meisten Anfärbungen die erst nach dem Gellauf erfolgen. Ein weiterer Vorteil ist, dass die markierten Proben zusammen einer Vorfraktionierung unterworfen werden können. Dazu werden die zu untersuchenden Proben mit den Fluoreszenzfarben kovalent

markiert, vermischt und vor der Verwendung in der 2D-Elektrophorese, beispielsweise durch *Free-flow*-Elektrophorese, in Untergruppen aufgelöst, die nachfolgend zweidimensional aufgetrennt werden. Dies macht die DIGE-Farbstoffe besonders interessant für Untersuchungen von Subproteomen. Durch eine Affinitätschromatographie mit immobilisierten Metallionen (IMAC) könnten Phosphoproteine aus bereits fluoreszenzmarkierten Proteinproben aufgereinigt werden. Auf diese Weise könnte das Phosphoproteom in deutlich höherer Auflösung untersucht werden als dies mit 1D-Gelen und Western-Blots auf Tyrosin- oder Serinphosphorylierung möglich ist.



**Abbildung 4-2 Anwendung der synthetisierten DIGE-Farbstoffe an murinem Herzhomogenaten**  
Diese Abbildung zeigt die Scans eines 2D Gels eines Herzhomogenates, das vor dem Gellauf jeweils in getrennten Ansätzen mit den synthetisierten Farbstoffen Cy3 und Cy5 kovalent markiert wurde. Anschließend wurden die differentiell markierten Proben zusammen im selben Gel aufgetrennt. Dargestellt sind die Scans auf Cy5 (A) und Cy3 (B) sowie die Überlagerung der erhaltenen Bilder (C).

Weitergehende Untersuchungen dieser Art sind zukünftig geplant. Da die kommerziell verfügbaren Farbstoffe sehr teuer sind, wurde damit begonnen, die Farbstoffe nach einem von Jung und Kim publizierten Verfahren in Eigensynthese herzustellen (Jung und Kim 2006). Derzeit ist die Synthese von zwei Farbstoffen (Cy3 und Cy5) erfolgreich abgeschlossen.

Diese selbst hergestellten Fluoreszenzfarbstoffe zeigten in ersten Vorversuchen eine hohe Sensitivität und eine gute Überlagerung der Spotmuster im 2D-Gel (Abbildung 4-2). Sie bieten damit die Möglichkeit, die Untersuchungen zu Trapidil-assoziierten Veränderungen im Proteom und insbesondere im Phosphoproteom deutlich effektiver als bisher fortzusetzen.

## 5 Zusammenfassung

Für das Triazolo-Pyrimidin Trapidil (Rocornal<sup>®</sup>) wurden kardioprotektive Wirkungen in klinischen Studien beschrieben und im experimentellen Ansatz bestätigt. Mechanistisch wird eine Aktivierung der membranständigen PKA II mit nachfolgender Wiederherstellung der reduzierten Proteinphosphorylierung nach Myokardischämie angenommen. Eine zentrale Zielstruktur scheint hierbei Phospholamban zu sein, das die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration steuert und einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung des Zytosols unter Ischämie entgegen wirkt. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die Überprüfung dieser Hypothese bei vergleichender Untersuchung in einem Ischämie-Modell des Herzens an WT- und  $\text{PLN}^{-/-}$ -Mäusen.

Dazu wurde ein Ischämie/Reperfusion-Protokoll für das isolierte, druckkonstant nach Langendorff perfundierte Mäuseherz erarbeitet, das zu einer partiell reversiblen und reproduzierbaren Schädigung der Herzen führt. Unter Kontrollbedingungen kam es zu einer signifikanten, ca. 40 bis 50 %igen Abnahme der Kontraktilitätsparameter sowie einer signifikanten Steigerung der enddiastolischen Kontraktur und CK-Freisetzung. Dies ging mit einer deutlich verminderten Phospholamban-Phosphorylierung und  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum einher. Diese Veränderungen wurden durch Trapidil (10  $\mu\text{M}$ ) weitgehend aufgehoben.

Langendorff-Herzen von  $\text{PLN}^{-/-}$ -Tieren, die dem gleichen Ischämie-/Reperfusion-Protokoll unterzogen wurden, zeigten einen den WT-Herzen vergleichbaren Schweregrad der Myokardschädigung. Die kardioprotektiven Wirkungen von Trapidil waren dagegen vollständig aufgehoben. Diese Befunde beweisen eine essentielle Rolle von Phospholamban für die kardioprotektiven Trapidilwirkungen bei Myokardischämie.

Zur weiteren Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Trapidil wurden Untersuchungen zur Proteinexpression vor und nach Trapidilbehandlung mittels 2D-Gelelektrophorese begonnen. Auffällig war dabei die verminderte Expression eines Proteins durch Trapidil, das massenspektrometrisch als *Enoyl Coenzym A Hydratase 1* (ECH1) identifiziert werden konnte und an der  $\beta$ -Oxidation freier Fettsäuren beteiligt ist. Die funktionelle Bedeutung dieses Befundes ist derzeit offen.

## 6 Summary

The triazolo-pyrimidine trapidil (Rocornal ®) is an established cardioprotective agent in both clinical studies and animal experiments. Mechanistically, an activation of the membrane bound PKA II has been suggested to explain these effects. This eventually results in restoration of the reduced protein phosphorylation subsequent to myocardial ischemia. Phospholamban, which controls cytosolic  $Ca^{2+}$  levels in order to prevent ischemia induced cytosolic  $Ca^{2+}$  overload, appears to be a key target of trapidil. This study investigates the significance of phospholamban for cardioprotective actions of trapidil in WT mice as opposed to PLN<sup>-/-</sup> mice.

The study was conducted in isolated, constant pressure-perfused Langendorff hearts of mice. An ischemia/reperfusion protocol was established which caused a partially reversible and reproducible myocardial injury. In untreated ischemic controls, there was a significant, 40 – 50 % reduction of myocardial contractility as well as a significant diastolic contracture and CK release into the cardiac perfusate. This was associated with a considerably reduced phosphorylation of phospholamban and  $Ca^{2+}$ -uptake into the sarcoplasmic reticulum. All of these changes were markedly and significantly reduced by trapidil (10  $\mu$ M).

Langendorff hearts of PLN<sup>-/-</sup> mice were subjected to the same experimental protocol and showed a comparable myocardial injury in terms of all parameters measured. However, the cardioprotective actions of trapidil were completely abolished. This documents an essential role of phospholamban for trapidil-induced protection from ischemic injury in the heart.

Changes in cardiac protein expression by trapidil were determined by 2D-electrophoresis to identify possible additional targets of trapidil action. So far, trapidil was shown to markedly reduce the expression of enoyl coenzyme A hydratase 1 (ECH1), an enzyme involved in  $\beta$ -oxidation of free fatty acids. The functional significance of this finding remains to be elucidated.

## 7 Literatur

- Aasum E, Hafstad AD, Larsen TS. Changes in substrate metabolism in isolated mouse hearts following ischemia-reperfusion. *Mol Cell Biochem.* 2003; 249:97-103.
- Bartel S, Vetter D, Schlegel WP, Wallukat G, Krause EG, Karczewski P. Phosphorylation of phospholamban at threonine-17 in the absence and presence of beta-adrenergic stimulation in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32:2173-2185.
- Bethke T, Mehl H, Meyer W, Schmitz W, Scholz H, Thomas K, Wenzlaff H. Effects of the triazolopyrimidine trapidil on force of contraction, beating frequency and phosphodiesterase I-IV activity in guinea-pig hearts. *Arzneimittelforschung.* 1991; 41:461-468.
- Block HU, Heinroth I, Giessler C, Ponicke K, Mentz P, Zehl U, Rettkowski W, Dunemann A, Forster W. [The modification of the biosynthesis and effect of thromboxane A2 and prostacyclin by trapidil (Rocornal)]. *Biomed Biochim Acta.* 1983; 42:283-299.
- Boateng S, Seymour AM, Dunn M, Yacoub M, Boheler K. Inhibition of endogenous cardiac phosphatase activity and measurement of sarcoplasmic reticulum calcium uptake: a possible role of phospholamban phosphorylation in the hypertrophied myocardium. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 239:701-705.
- Bönisch D, Weber AA, Wittpoth M, Osinski M, Schrör K. Antimitogenic effects of trapidil in coronary artery smooth muscle cells by direct activation of protein kinase A. *Mol Pharmacol.* 1998; 54:241-248.
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis.* 2004; 25:1327-1333.
- Carr DW, Stofko-Hahn RE, Fraser ID, Bishop SM, Acott TS, Brennan RG, Scott JD. Interaction of the regulatory subunit (RII) of cAMP-dependent protein kinase with RII-anchoring proteins occurs through an amphipathic helix binding motif. *J Biol Chem.* 1991; 266:14188-14192.
- Chu G, Lester JW, Young KB, Luo W, Zhai J, Kranias EG. A single site (Ser16) phosphorylation in phospholamban is sufficient in mediating its maximal cardiac responses to beta-agonists. *J Biol Chem.* 2000; 275:38938-38943.
- Demaison L, Moreau D, Martine L, Chaudron I, Grynberg A. Myocardial ischemia and in vitro mitochondrial metabolic efficiency. *Mol Cell Biochem.* 1996; 158:161-169.

- Dieckmann-Schuppert A, Schnittler HJ. A simple assay for quantification of protein in tissue sections, cell cultures, and cell homogenates, and of protein immobilized on solid surfaces. *Cell Tissue Res.* 1997; 288:119-126.
- Dittrich P, Fiehring H, Brunn F, Rothe R, Lauten A. Klinische Untersuchungen mit Rocornal (Trapymin) - einer neuen kardioaktiven Substanz. *Dtsch Gesundheitsw.* 1971; 26:1684-1688.
- Dodge-Kafka KL, Langeberg L, Scott JD. Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of A-kinase anchoring proteins. *Circ Res.* 2006; 98:993-1001.
- Drago GA, Colyer J. Discrimination between two sites of phosphorylation on adjacent amino acids by phosphorylation site-specific antibodies to phospholamban. *J Biol Chem.* 1994; 269:25073-25077.
- Edes I, Kranias EG. Phospholamban and troponin I are substrates for protein kinase C in vitro but not in intact beating guinea pig hearts. *Circ Res.* 1990; 67:394-400.
- Ferrari R, Pedersini P, Bongrazio M, Gaia G, Bernocchi P, Di Lisa F, Visioli O. Mitochondrial energy production and cation control in myocardial ischaemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol.* 1993; 88:495-512.
- Fink MA, Zakhary DR, Mackey JA, Desnoyer RW, Apperson-Hansen C, Damron DS, Bond M. AKAP-mediated targeting of protein kinase a regulates contractility in cardiac myocytes. *Circ Res.* 2001; 88:291-297.
- Fling SP, Gregerson DS. Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem.* 1986; 155:83-88.
- Frank KF, Bolck B, Erdmann E, Schwinger RH. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. *Cardiovasc Res.* 2003; 57:20-27.
- Füller H, Hauschild F, Modersohn D, Thomas E. Pharmakologie des 5-Methyl-7-diäthylamino-s-triazolo-(1,5-a) pyrimidin (Trapymin, Rocornal), einer Verbindung mit koronargefäßerweiternder Wirkung. *Pharmazie.* 1971; 26:554-562.
- Harder S, Thurmann PA, Hellstern A, Benjaminov A. Pharmacokinetics of trapidil, an antagonist of platelet derived growth factor, in healthy subjects and in patients with liver cirrhosis. *Br J Clin Pharmacol.* 1996; 42:443-449.
- Hirayama A, Kodama K, Yui Y, Nonogi H, Sumiyoshi T, Origasa H, Hosoda S, Kawai C. Effect of trapidil on cardiovascular events in patients with coronary artery disease (results from the Japan Multicenter Investigation for Cardiovascular Diseases-Mochida [JMIC-M]). *Am J Cardiol.* 2003; 92:789-793.

- Hirche H, Franz C, Bos L, Bissig R, Lang R, Schramm M. Myocardial extracellular K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> increase and noradrenaline release as possible cause of early arrhythmias following acute coronary artery occlusion in pigs. *J Mol Cell Cardiol.* 1980; 12:579-593.
- Ishikura K, Fujita H, Hida M, Awazu M. Trapidil inhibits platelet-derived growth factor-induced migration via protein kinase A and RhoA/Rho-associated kinase in rat vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 2005; 515:28-33.
- James P, Inui M, Tada M, Chiesi M, Carafoli E. Nature and site of phospholamban regulation of the Ca<sup>2+</sup> pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature.* 1989; 342:90-92.
- Jung ME, Kim WJ. Practical syntheses of dyes for difference gel electrophoresis. *Bioorg Med Chem.* 2006; 14:92-97.
- Jurevicius J, Fischmeister R. cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac Ca<sup>2+</sup> channels by beta-adrenergic agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93:295-299.
- Krause EG, Karczewski. Hemmung der zyκλο-AMP spaltenden Nukleotidhydrolase des Herzens durch 5-Methyl-7-diäthylamino-s-triazol-(1,5-alpha)pyrimidin (Rocornal). *Acta Biol Med Ger.* 1976; 35:167-173.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227:680-685.
- Lampe D, Mai I, Busse E. Beitrag zum Wirkungsmechanismus von Trapidil (Rocornal). *Pharmazie.* 1975; 30:807-808.
- Lee HC, Smith N, Mohabir R, Clusin WT. Cytosolic calcium transients from the beating mammalian heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84:7793-7797.
- Lopaschuk GD. Targets for modulation of fatty acid oxidation in the heart. *Curr Opin Investig Drugs.* 2004; 5:290-294.
- Lopaschuk GD, Spafford MA. Acute insulin withdrawal contributes to ischemic heart failure in spontaneously diabetic BB Wistar rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 1990; 68:462-466.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-275.
- Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, Doetschman T, Kranias EG. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ Res.* 1994; 75:401-409.
- Lüss H, Meissner A, Rolf N, Van Aken H, Boknik P, Kirchhefer U, Knapp J, Laer S, Linck B, Luss I, Muller FU, Neumann J, Schmitz W. Biochemical

- mechanism(s) of stunning in conscious dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 279:H176-184.
- Lygren B, Carlson CR, Santamaria K, Lissandron V, McSorley T, Litzenberg J, Lorenz D, Wiesner B, Rosenthal W, Zaccolo M, Tasken K, Klussmann E. AKAP complex regulates Ca<sup>2+</sup> re-uptake into heart sarcoplasmic reticulum. *EMBO Rep*. 2007; 8:1061-1067.
- Maresta A, Balducelli M, Latini R, Bernardi G, Moccetti T, Sosa C, Barlera S, Varani E, Ribeiro da Silva EE, Monici Preti A, Maggioni AP. Starc II, a multicenter randomized placebo-controlled double-blind clinical trial of trapidil for 1-year clinical events and angiographic restenosis reduction after coronary angioplasty and stenting. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2005; 64:375-382.
- Martin M, Meyer-Kirchrath J, Kaber G, Jacoby C, Flögel U, Schrader J, Rütter U, Schrör K, Hohlfeld T. Cardiospecific overexpression of the prostaglandin EP3 receptor attenuates ischemia-induced myocardial injury. *Circulation*. 2005; 112:400-406.
- Mattiazzi A, Mundina-Weilenmann C, Guoxiang C, Vittone L, Kranias E. Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovasc Res*. 2005; 68:366-375.
- Meinertz T, Lehmacher W. Trapidil is as effective as isosorbide-dinitrate for treating stable angina pectoris: a multinational, multicenter, double-blind, randomized study. *Clin Res Cardiol*. 2006; 95:217-223.
- Meyer-Kirchrath J, Debey S, Glandorff C, Kirchrath L, Schrör K. Gene expression profile of the Gs-coupled prostacyclin receptor in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol*. 2004; 67:757-765.
- Movsesian MA, Nishikawa M, Adelstein RS. Phosphorylation of phospholamban by calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. Stimulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium uptake. *J Biol Chem*. 1984; 259:8029-8032.
- Mundina-Weilenmann C, Ferrero P, Said M, Vittone L, Kranias EG, Mattiazzi A. Role of phosphorylation of Thr(17) residue of phospholamban in mechanical recovery during hypercapnic acidosis. *Cardiovasc Res*. 2005; 66:114-122.
- Nayler WG. The role of calcium in the ischemic myocardium. *Am J Pathol*. 1981; 102:262-270.
- Neely JR, Feuvray D. Metabolic products and myocardial ischemia. *Am J Pathol*. 1981; 102:282-291.
- Nieder J, Claus P, Augustin W. Effects of trapidil on the PGI<sub>2</sub> and TXA<sub>2</sub> synthesis in human umbilical veins perfused in vitro. *Prostaglandins*. 1995; 49:311-318.
- Ohnishi H, Kosuzume H, Hayashi Y, Yamaguchi K, Suzuki Y, Itoh R. Effects of trapidil on thromboxane A<sub>2</sub>-induced aggregation of platelets, ischemic

- changes in heart and biosynthesis of thromboxane A<sub>2</sub>. *Prostaglandins Med.* 1981; 6:269-281.
- Osinski M, Schrör K. Trapidil mediates its antimitogenic effect by direct activation of protein kinase AII. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1999; 359:R63.
- Pearson RB, Kemp BE. Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol.* 1991; 200:62-81.
- Raubach KH, Vlahov V, Wolter K, Bussmann WD. Double-blind randomized multicenter study on the efficacy of trapidil versus isosorbide dinitrate in stable angina pectoris. *Clin Cardiol.* 1997; 20:483-488.
- Said M, Vittone L, Mundina-Weilenmann C, Ferrero P, Kranias EG, Mattiazzi A. Role of dual-site phospholamban phosphorylation in the stunned heart: insights from phospholamban site-specific mutants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285:H1198-1205.
- Salem JE, Saidel GM, Stanley WC, Cabrera ME. Mechanistic model of myocardial energy metabolism under normal and ischemic conditions. *Ann Biomed Eng.* 2002; 30:202-216.
- Schonekess BO, Allard MF, Lopaschuk GD. Propionyl L-carnitine improvement of hypertrophied heart function is accompanied by an increase in carbohydrate oxidation. *Circ Res.* 1995a; 77:726-734.
- Schonekess BO, Brindley PG, Lopaschuk GD. Calcium regulation of glycolysis, glucose oxidation, and fatty acid oxidation in the aerobic and ischemic heart. *Can J Physiol Pharmacol.* 1995b; 73:1632-1640.
- Schoutsen B, Blom JJ, Verdouw PD, Lamers JM. Calcium transport and phospholamban in sarcoplasmic reticulum of ischemic myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 1989; 21:719-727.
- Schrör K, Addicks K, Darius H, Ohlendorf R, Rosen P. PGI<sub>2</sub> inhibits ischemia-induced platelet activation and prevents myocardial damage by inhibition of catecholamine release from adrenergic nerve terminals. Evidence for cAMP as common denominator. *Thromb Res.* 1981; 21:175-180.
- Schrör K, Zimmermann KC, Tannhäuser R. Augmented myocardial ischaemia by nicotine--mechanisms and their possible significance. *Br J Pharmacol.* 1998a; 125:79-86.
- Schrör K, Zwaka, Tannhäuser. Cardioprotective actions of trapidil in myocardial ischemia involve inhibition of the activation of NFκB. *Faseb J.* 1998b; 12
- Sichelschmidt OJ, Hahnefeld C, Hohlfeld T, Herberg FW, Schrör K. Trepidil protects ischemic hearts from reperfusion injury by stimulating PKAII activity. *Cardiovasc Res.* 2003; 58:602-610.

- Singh RB, Chohan PK, Dhalla NS, Netticadan T. The sarcoplasmic reticulum proteins are targets for calpain action in the ischemic-reperfused heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2004; 37:101-110.
- Szentandrassy N, Perez-Bido MR, Alonzo E, Negretti N, O'Neill SC. Protein kinase A is activated by the n-3 polyunsaturated fatty acid eicosapentaenoic acid in rat ventricular muscle. *J Physiol.* 2007; 582:349-358.
- Tada M. Calcium cycling proteins of the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circ J.* 2003; 67:729-737.
- Tada M, Ohmori F, Nimura Y, Abe H. Effect of myocardial protein kinase modulator on adenosine 3' : 5'-monophosphate-dependent protein kinase-induced stimulation of calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biochem.* 1977; 82:885-892.
- Tasken K, Aandahl EM. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev.* 2004; 84:137-167.
- Valverde CA, Mundina-Weilenmann C, Reyes M, Kranias EG, Escobar AL, Mattiazzi A. Phospholamban phosphorylation sites enhance the recovery of intracellular Ca<sup>2+</sup> after perfusion arrest in isolated, perfused mouse heart. *Cardiovasc Res.* 2006; 70:335-345.
- van der Vusse GJ, Stam H. Lipid and carbohydrate metabolism in the ischaemic heart. *Basic Res Cardiol.* 1987; 82 Suppl 1:149-153.
- Vangheluwe P, Tjwa M, Van Den Bergh A, Louch WE, Beullens M, Dode L, Carmeliet P, Kranias E, Herijgers P, Sipido KR, Raeymaekers L, Wuytack F. A SERCA2 pump with an increased Ca<sup>2+</sup> affinity can lead to severe cardiac hypertrophy, stress intolerance and reduced life span. *J Mol Cell Cardiol.* 2006; 41:308-317.
- Vittone L, Mundina-Weilenmann C, Said M, Ferrero P, Mattiazzi A. Time course and mechanisms of phosphorylation of phospholamban residues in ischemia-reperfused rat hearts. Dissociation of phospholamban phosphorylation pathways. *J Mol Cell Cardiol.* 2002; 34:39-50.
- Walsh DA, Glass DB, Mitchell RD. Substrate diversity of the cAMP-dependent protein kinase: regulation based upon multiple binding interactions. *Curr Opin Cell Biol.* 1992; 4:241-251.
- Will H, Kuttner I, Vetter R, Will-Shahab L, Kemsies C. Early presence of phospholamban in developing a chick heart. *FEBS Lett.* 1983; 155:326-330.
- Wong W, Scott JD. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5:959-970.
- Xie Y, Zhu Y, Zhu WZ, Chen L, Zhou ZN, Yuan WJ, Yang HT. Role of dual-site phospholamban phosphorylation in intermittent hypoxia-induced

- 
- cardioprotection against ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 288:H2594-2602.
- Yamaguchi K, Suzuki K, Niho T, Sato M, Ito C, Ohnishi H. Reduction of myocardial infarct size by trapidil in anesthetized dogs. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1983; 5:499-505.
- Yasue H, Ogawa H, Tanaka H, Miyazaki S, Hattori R, Saito M, Ishikawa K, Masuda Y, Yamaguchi T, Motomiya T, Tamura Y. Effects of aspirin and trapidil on cardiovascular events after acute myocardial infarction. Japanese Antiplatelets Myocardial Infarction Study (JAMIS) Investigators. *Am J Cardiol.* 1999; 83:1308-1313.
- Zaccolo M. Phosphodiesterases and compartmentalized cAMP signalling in the heart. *Eur J Cell Biol.* 2006; 85:693-697.
- Zaccolo M, Pozzan T. Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science.* 2002; 295:1711-1715.

## 8 Veröffentlichungen

### 8.1 Fachzeitschriften

Martin M, Meyer-Kirchrath J, Kaber G, Jacoby C, Flögel U, Schrader J, Rütger U, Schrör K, Hohlfeld T. Cardiospecific overexpression of the prostaglandin EP<sub>3</sub> receptor attenuates ischemia-induced myocardial injury. *Circulation*. 2005, 112(3):400-6.

Wolkart G, Kaber G, Kojda G, Brunner F. Role of endogenous hydrogen peroxide in cardiovascular ischaemia/reperfusion function: studies in mouse hearts with catalase-overexpression in the vascular endothelium. *Pharmacol Res*. 2006, 54(1):50-6.

Pape R, Rauch BH, Rosenkranz AC, Kaber G, Schrör K. Transcriptional Inhibition of Protease-Activated Receptor-1 Expression by Prostacyclin in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, *Published online before print December 27, 2007.*

Meyer-Kirchrath J, Martin M, Jacoby C, Flögel U, Kaber G, Runde E, Marzoll A, Fischer JW, Schrader J, Schrör K, Hohlfeld T. Cardiac overexpression of the prostaglandin EP<sub>3</sub> receptor induces left ventricular hypertrophy and dilatation. (*eingereicht*)

Kaber G, Sichelschmidt O, Martin M, Schrör K. Proteinphosphorylation by trapidil, a selective activator of membrane bound PKA in reperfused ischemic mouse hearts. (*Manuskript in Vorbereitung*)

Kaber G<sup>\*</sup>, Baumgärtel-Allekotte D<sup>\*</sup>, Kaiser B, Heim HK, Schrör K (\* equally contributed). Long-term effect of rofecoxib on endothelial function in rabbits. (*Manuskript in Vorbereitung*)

Stampfuss JJ, Censarek P, Fischer JW, Kaber G, Rauch BH, Schulze-Osthoff K, Schrör K, Weber AA. Down-Modulation of P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) in monocytes undergoing apoptosis. (*Manuskript in Vorbereitung*)

Kaiser B<sup>\*</sup>, Baumgärtel-Allekotte D<sup>\*</sup>, Kaber G, Rauch BH, Heim HK, Weber AA, Habenicht AJ, Schrör K (\*equally contributed). Antagonism of the antithrombotic and antiatherosclerotic actions of aspirin by rofecoxib in the cholesterol-fed rabbit. (*Manuskript in Vorbereitung*)

## 8.2 Kongressbeiträge

Martin M, Meyer-Kirchrath J, Kaber G, Jakoby C, Flögel U, Schrader J, Schrör K, Hohlfeld T. Linksventrikuläre Dysfunktion durch kardiale Überexpression des EP3 Prostaglandin Rezeptors in der Maus. *Z Kardiol* 2004 93: Suppl 3.

Martin M, Meyer-Kirchrath J, Kaber G, Jacoby C, Flögel U, Schrader J, Rüther U, Schrör K, Hohlfeld T. Cardiospecific overexpression of the prostaglandin EP3 receptor attenuates ischemia-induced myocardial injury. *Cardio-Visionen* 2004.

Martin M, Kaber G, Jakoby C, Flögel U, Schrader J, Schrör K, Hohlfeld T, Meyer-Kirchrath J. Kardiospezifische Überexpression des Prostaglandin EP3 Rezeptors reduziert die Schädigung des reperfundierten ischämischen Myokards. *Z Kardiol* 2005 94 Suppl 1.

Martin M, Kaber G, Jacoby C, Flögel U, Schrader J, Schrör K, Hohlfeld T, Meyer-Kirchrath J. Cardio-specific overexpression of prostaglandin EP3 receptor reduces ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2005 (Suppl.): Vol. 112.

Kaber G, Baumgärtel D, Heim HK, Kaiser B, Schrör K. Long-term effects of rofecoxib on myocardial ischemia/reperfusion injury in cholesterol-fed rabbits. *Hämostaseologie* 2005, 25.

Kaber G, Sichelschmidt O, Martin M, Hohlfeld T, Schrör K. Restored phosphorylation of phospholamban during ischemia/reperfusion mediates the cardioprotective action of trapidil. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2007 375 (Suppl.1).

## 9 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karsten Schrör für die Überlassung des Themas sowie die anregenden Diskussionen und zahlreichen Ratschläge. Besonders möchte ich mich für die Unterstützung in den letzten Wochen vor der Fertigstellung der Dissertationsschrift bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Hans-Dieter Höltje danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. Artur-Aron Weber möchte ich danken für wertvolle Anregungen und Diskussionen.

Frau Erika Lohmann und Frau Karin Montag möchte ich für die ständige und freundliche Unterstützung bei der Bewältigung aller organisatorischen Probleme sowie für die mentale Unterstützung danken. Die Kekse haben über viele frustrierende Momente hinweggetröstet.

Herrn Grad.-Ing. Hans-Jürgen Springer möchte ich für seine immer freundliche und sehr kreative Unterstützung bei der Lösung aller technischen Fragen danken. Ohne seine Bereitschaft bis in die Abendstunden an der Konstruktion und Reparatur der Messgeräte zu arbeiten, wären viele Versuche nicht möglich gewesen.

Frau Petra Kuger möchte ich für die Nachhilfe in der Bedienung von Microsoft Office und bei der Erstellung von Abbildungen danken.

Kerstin Freidel und Bärbel Reupert danke ich für die technische Assistenz im Labor und ihre Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen.

Allen Kollegen danke ich für die stete Hilfsbereitschaft, kontrovers geführte Diskussionen und die spannende Gestaltung des abendlichen Freizeitprogramms.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Freundin Nadine für die ständige seelische und moralische Unterstützung.

Herrn Dr. Lehr danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen.

Der Forschungskommission der Heinrich-Heine-Universität der UCB-Pharma sowie der Forschungsgruppe Herz-Kreislauf e. V. danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

## **10 Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere an Eides statt, dass die vorliegende Doktorschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt worden ist, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt worden sind, den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht zu haben, und dass diese Doktorschrift an keiner anderen Fakultät eingereicht worden ist.

Düsseldorf, den

## 11 Lebenslauf

### Person:

Name: Gernot Kaber

Geburtsdatum: 21.11.1975

Geburtsort: Krefeld

### Promotion:

Seit 10/2002 Promotion unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Karsten Schrör am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf.

### Studium:

1996 – 2001 Studium der Pharmazie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

01/2001 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

05/2002 Approbation zum Apotheker

### Geleistete Dienste:

1995 – 1996 Wehrdienst beim Heeresunterstützungskommando Mönchengladbach

### Schule:

1982 - 1986 Grundschule in Grefrath

1986 - 1995 Gymnasium und Abitur an der Liebfrauenschule Mülhausen