

Untersuchungen zum Mechanismus der kardioprotektiven
Wirkung von Trapidil bei experimenteller
Ischämie/Reperfusion - Bedeutung von Proteinkinase A und
Phospholamban

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Oliver J. Sichelschmidt

aus Schwelm

Düsseldorf 2002

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

Referent: Prof. Dr. Karsten Schrör
Korreferent: Prof. Dr. Manfred Grieshaber

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.03

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ischämie und Reperfusion des Myokards	1
1.2	Trapidil	5
1.3	Die Proteinkinase A	7
1.4	Die Rolle von Phospholamban in der Ca^{2+} -Homöostase	11
1.5	Fragestellung	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Das Langendorff-Modell	15
2.1.1	Das Kaninchen-Langendorff-Modell	15
2.1.1.1	Präparation des Kaninchen-Herzens	15
2.1.1.2	Funktionelle Messungen am Kaninchen-Herz	16
2.1.1.3	Versuchsprotokoll der Kaninchen-Versuche	16
2.1.2	Das Mäuse-Langendorff-Modell	17
2.1.2.1	Präparation des Mäuse-Herzens	17
2.1.2.2	Funktionelle Messungen am Mäuse-Herz	18
2.1.2.3	Versuchsprotokoll der Mäuse-Versuche	19
2.2	Messungen der Kreatinkinase	20
2.3	Messung von 6-oxo-PGF _{1α}	20
2.4	Bestimmung der Infarktgröße mit Triphenyltetrazoliumchlorid	21
2.5	Western-Blot	21
2.5.1	Proteingewinnung aus Herz-Gewebe	21
2.5.2	Auftrennung der Proteine	22
2.5.3	Detektion spezifischer Proteine	23
2.5.4	'stripping' der PVDF-Membranen	23
2.5.5	Prüfung auf gleichmäßige Beladung	25
2.5.6	Densitometrische Auswertung der Röntgenfilme	25
2.6	Proteinbestimmung	25
2.7	Bestimmung der PKA-Aktivität	25

2.8	Bildung von PKA-Holoenzymen aus rekombinanten Untereinheiten	27
2.9	Lösungen und Puffer	27
2.10	Statistik	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Versuche nach Langendorff mit Kaninchen	30
3.1.1	Trapidil-Applikation über den gesamten Versuchszeitraum	30
3.1.2	Behandlung von Ischämie/Reperfusion-Herzen mit Trapidil ausschließlich bei Reperfusion	36
3.1.3	Behandlung von Ischämie/Reperfusion-Herzen mit Cycloheximid	38
3.2	Versuche nach Langendorff mit Mäusen	41
3.2.1	Etablierung des Modells	41
3.2.2	Einfluss von Trapidil bei Ischämie/Reperfusion bei Mäusen	45
3.3	Versuche zur Modulation der PKA-Aktivität mit Trapidil	56
4	Diskussion	60
5	Literaturverzeichnis	72
6	Zusammenfassung	86
Appendix		
Appendix A	Lebenslauf	88
Appendix B	Eidesstattliche Erklärung	89
Appendix C	Danksagung	90
Appendix D	Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit	92

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AV-Knoten	<u>A</u> trio <u>v</u> entrikular-Knoten
C	katalytische Untereinheit
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CHX	Cycloheximid
CK	Kreatinkinase (<u>c</u> reatine <u>k</u> inase)
CPP	koronarer Perfusionsdruck (<u>c</u> oronary <u>p</u> erfusion <u>p</u> ressure)
-dp/dt	Relaxationsgeschwindigkeit
+dp/dt	Kontraktionsgeschwindigkeit
kDa	kilo-Dalton
KG	Körpergewicht
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck (<u>l</u> eft <u>v</u> entricular <u>e</u> nd <u>d</u> ia <u>s</u> to <u>l</u> ic <u>p</u> ressure)
Δ LVP	Änderung des linksventrikulären Druckes (<u>l</u> eft <u>v</u> entricular <u>p</u> ressure)
n.s.	nicht signifikant
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid <u>g</u> el- <u>E</u> lektrophorese
PDE	Phosphodiesterase
PGI ₂	Prostacyclin
PKI	Proteinkinase-Inhibitor
R	regulatorische Untereinheit
RIA	Radio-Immuno-Assay
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
TPD	Trapidil
TTC	<u>T</u> riphenyl <u>t</u> etrazolium <u>c</u> hlorid

1. Einleitung

1.1 Ischämie und Reperfusion des Myokards

Zellen aller Gewebe unterliegen einer irreversiblen Schädigung und Zelltod nach Entzug von Sauerstoff und anderen Nährstoffen. Die myokardiale Ischämie initiiert eine Folge von fortschreitend tiefgreifenderen zellulären Änderungen, die, wenn nicht durch rechtzeitig frühe Reperfusion unterbrochen, unvermeidlich in Zelltod und Gewebsnekrose gipfeln. Eine Übersicht über einige der zahlreichen Ischämie-induzierten Änderungen in den Kardiomyozyten und deren Zeitverlauf ist in Abbildung 1-1 gegeben. Bereits innerhalb weniger Sekunden nach Unterbrechung des koronaren Blutflusses ist der Sauerstoff in dem nun nicht mehr versorgten Gewebereich verbraucht und es kommt zu gravierenden metabolischen Änderungen. Durch den Mangel an Sauerstoff wird die mitochondriale oxidative Phosphorylierung gehemmt. Gleichzeitig werden die Glykogenolyse und die anaerobe Glykolyse aktiviert, was auf einem starken Anstieg der Aktivität der Glykogenphosphorylase (Kübler und Spieckermann, 1970; Wollenberger und Krause, 1969) bzw. der Phosphofruktokinase (Williamson, 1966) basiert. Bei einer schweren Ischämie nimmt aber die anaerobe Glykolyse aufgrund der Akkumulation von NADH, H^+ und Laktat rasch wieder ab, da diese Substanzen die Schlüsselenzyme der Glykolyse hemmen (Mochizuki und Neely, 1979). Weiterhin führen Laktat und die über die Akkumulation von H^+ entstehende Azidose zu einer Verstärkung der Schädigung des Myokards. So kommt es bei hohen Laktat-Konzentrationen zu einer mitochondrialen Schwellung (Armiger et al., 1975) und Azidose führt über den Na^+H^+ -Antiporter zunächst zu einem Anstieg der intrazellulären Na^+ -Konzentration und als Folge dessen über den Na^+Ca^{2+} -Antiporter zu einer Ca^{2+} -Überladung der Zellen. Diese Ca^{2+} -Überladung der Zellen hat schwerwiegende negative Konsequenzen für die Zelle, da Ca^{2+} eine Aktivierung von Proteasen, Hydrolasen, Lipasen und Phospholipasen bewirkt (Tolnai und Korecky, 1986; McCord et al., 1985; Bolli et al., 1983; Farber et al., 1981), den Verbrauch von ATP über die Aktivierung zahlreicher ATPasen erhöht (Nayler, 1981 A) und die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien blockiert (Tsokos und Bloom, 1977). Auch wenn im ischämischen Myokard der Hauptenergieverbraucher, die myofibrilläre ATPase, aufgrund der schnell sistierenden kontraktilen Funktion nicht mehr ins Gewicht fällt, kommt es dennoch zu einem raschen Abfall der Konzentrationen energiereicher Phosphate. Dies betrifft vor allem die intrazelluläre ATP-Konzentration, da durch die Aktivität der Ca^{2+} -ATPasen und der Na^+K^+ -ATPase der

Verbrauch von ATP anhält (Jennings et al., 1990; Rouslin et al., 1986). Ein Sistieren der kontraktilen Funktion ist eine der ersten Folgen der Myokardischämie (Tennant und Wiggers, 1935). Eine Hemmung der Kontraktion ist bereits nach 6 – 10 s zu beobachten und geht dem Konzentrationsabfall energiereicher Phosphate voraus (Covell et al., 1967). Trotz zahlreicher Hypothesen zur Ursache dieser frühen kontraktilen Störung konnte bisher keine Erklärung für dieses Phänomen gefunden werden. Unter anderem wurden eine verminderte intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung und die zelluläre Azidose verantwortlich gemacht (Steenbergen et al., 1977). Während der myokardialen Ischämie kommt es ausserdem zu zwei wesentlichen Veränderungen des Fettstoffwechsels. Zum einen führt die Hemmung der Fettsäureoxidation zu einer Akkumulation von Lipid-Metaboliten, z.B. von freien Fettsäuren, Acyl-CoA und Acylcarnitin (Neely und Feuvray, 1981), zum anderen werden Membran-Phospholipide über Phospholipasen gespalten (Chien et al., 1981). Beide Phänomene werden mit einer Vielzahl zellulärer Störungen in Verbindung gebracht.

Ein weiteres, sehr frühes Ereignis ist, bereits vor einem nennenswerten Verlust von ATP, ein erhöhter K^+ -Ausstroms aus der Zelle (Case, 1971; Kleber, 1983). Weiterhin finden sich massive elektrophysiologische Veränderungen im ischämischen Myokard. So kommt es zu einer zunehmenden Depolarisation der Zellen, einer Verkürzung des Aktionspotentials mit verlangsamter intramyokardialer Leitung und zunehmender Refraktärzeit (Corr und Sobel, 1979). Die Ursachen dieser Veränderungen konnten jedoch bis heute nicht vollständig aufgeklärt werden. Als Ursache diskutiert werden dabei die extrazelluläre Hyperkaliämie (Kodama et al., 1984), die intrazelluläre Azidose (Hirche et al., 1980; Kodama et al., 1984), eine lokale Katecholamin-Freisetzung (Hirche et al., 1980; Kurz et al., 1995), Störungen des Lipid-Stoffwechsels (Most et al., 1977) und die Ca^{2+} -Überladung der Zellen (Nayler, 1981 B).



Abbildung 1-1: Einige Ischämie-induzierte Veränderungen in Kardiomyozyten sowie ihr grober zeitlicher Verlauf. Abbildung nach Hearse (1998).

In den ersten Minuten einer globalen Ischämie wird die Katecholamin-Freisetzung aus den sympathischen Nervenendigungen im ischämischen Bereich durch lokale Faktoren wie Adenosin, Azidose und Hyperkaliämie unterdrückt (Seyfarth et al., 1993; Schömig und Richardt, 1990; Richardt et al., 1987). Nach etwa 15 Minuten versagen jedoch diese lokalen protektiven Mechanismen vollständig und es kommt zu einer massiven, nicht-exozytotischen Freisetzung von Noradrenalin aus den sympathischen Nervenendigungen in den interstitiellen Raum. So können die kardialen α - und β -Rezeptoren, welche in der frühen Ischämie noch funktionell gekoppelt bleiben, aktiviert werden und es kommt zu einer adrenergen Aktivierung des Myokards. Diese adrenerge Stimulation des Myokards ist wahrscheinlich zusammen mit den oben beschriebenen elektrophysiologischen Änderungen die Basis für lebensbedrohliche Rhythmusstörungen, die aufgrund 'getriggert' Aktivität, gesteigerter Automatie und Mikro-Reentry-Mechanismen entstehen (Janse und Kleber, 1981).

Nach einer gewissen Zeit einer schweren myokardialen Ischämie kommt es zum Übergang von einer reversiblen Schädigung zu einer irreversiblen Schädigung. Dies bedeutet, dass die Zellen sich nicht mehr erholen, sobald die schädigende Ursache wegfällt, sondern dass es trotz Aufhebung der Ursache im weiteren Verlauf zum Tod der Zelle kommt (Jennings et al., 1960). Dieser Übergang zwischen reversiblen und irreversiblen Schaden tritt im Tiermodell nach 20 bis 60 min einer schweren Myokardischämie auf, noch lange vor einem mit den üblichen histologischen Methoden erkennbaren Zelltod. Die letztlich ausschlaggebende Ursache für den Übergang von der reversiblen zu irreversiblen Schädigung der Kardiomyozyten konnte bisher *in vivo* noch nicht geklärt werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass entweder der Verlust an energiereichen Phosphaten (Jennings et al., 1978; Jennings et al., 1990), die Akkumulation toxischer Metabolite oder ein Zusammenspiel beider Faktoren hierfür verantwortlich sind. Eine wesentliche Ursache in der Entstehung des Zelltodes scheint schließlich in der Schädigung der Plasmamembran zu liegen (Jennings et al., 1990). Dies führt zu einem Austausch von Substanzen zwischen dem Intra- und dem Extrazellulärraum. In der Folge kommt es zu einer weiteren Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sowie einem Verlust von Stoffwechsellzymen, Mg^{2+} und K^+ , was zu einer Unterbrechung der notwendigen metabolischen Vorgänge der Zelle führt.

Solange eine myokardiale Ischämie noch nicht zu einer irreversiblen Schädigung der Zellen geführt hat, müsste die Reperfusion des Myokards zu einer Erholung der Zellen führen. Es ist jedoch bekannt, dass der irreversible Schaden nach erfolgter Reperfusion nicht ausschließlich

vom Ausmaß der Schädigung vor Beginn der Reperfusion bestimmt wird. Die Reperfusion an sich übt einen schädigenden Einfluss auf das Myokard aus, es kommt zum sogenannten Reperfusionsschaden (Yellon und Baxter, 2000). Die Ursachen für diesen weiteren Schaden sind die durch den Wiedereintritt von Sauerstoff in das ischämische Gewebe entstehenden freien Sauerstoff-Radikale (Bolli et al., 1989), aber auch die Überladung der Zellen mit Ca^{2+} (Gross et al., 1999), eine endotheliale und mikrovaskuläre Dysfunktion (Carden und Granger, 2000; Granger, 1999) sowie Veränderungen des myokardialen Metabolismus (Rao et al., 2001; Merante et al., 1998). Die bekannteste Manifestation des Reperfusionsschadens ist das myokardiale 'stunning', eine reversible postischämische kontraktile Dysfunktion von durch Reperfusion gerettetem vitalem Gewebe (Kloner et al., 2001; Ambrosio und Tritto, 2001). Eine weitere Manifestation ist die mikrovaskuläre Dysfunktion. Es kommt während der Reperfusion zu einer massiven Störung der Endothelzellen, was z.B. zu einer Vasokonstriktion sowie einer Plättchen- und Leukozyten-Aktivierung führen kann (Carden und Granger, 2000; Granger, 1999).

1.2 Trepidil

Akutes Koronarsyndrom und Herzversagen, resultierend aus einer ischämischen Schädigung des Myokards, sind die Ursache für einen sehr großen Anteil der Todesfälle in der industrialisierten Welt. Im Interesse der Forschung steht daher eine Verbesserung der therapeutischen Maßnahmen. Unter den vielen pharmakologischen Ansätzen, die zur Limitierung des ischämischen Myokardschadens entwickelt wurden, hat sich die Substanz Trepidil auch in klinischen Studien bewährt. So war unter anderem bei Behandlung mit Trepidil eine signifikante Reduktion der Häufigkeit kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten nach akutem Myokardinfarkt zu beobachten (Yasue et al., 1999).

Bereits 1971 wurde von Tenor und Ludwig die Synthese neuer s-Triazolo [1.5- α] Pyrimidine beschrieben. Unter diesen Substanzen befand sich auch das 5-Methyl-7-diethylamino-s-triazolo [1.5- α] pyrimidin, eine Substanz, welche später den generischen Namen Trepidil erhielt. Die Substanz, welche in Deutschland zur Behandlung der ischämischen Herzkrankheit zugelassen wurde (Rocornal[®]) und seither umfangreich eingesetzt wird (Yasue et al., 1999), wurde zunächst als Vasodilatator mit einer gewissen Präferenz für Koronargefäße angesehen (Füller et al., 1971). In zahlreichen späteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Trepidil eine Reihe von Wirkungen auf das kardiovaskuläre System ausübt. Zu diesen

Wirkungen gehören die Hemmung der Thrombozyten-Aktivierung (Block et al., 1983), die Hemmung der Proliferation glatter Muskelzellen nach Stimulation mit 'platelet-derived growth factor' (PDGF) (Cercek et al., 1993; Giessler et al., 1987; Tiell et al., 1983; Ohnishi et al., 1982) sowie die Hemmung von Phosphodiesterasen (PDEs) (Krause und Karczewski, 1976; Lampe et al., 1975). Allerdings erwiesen sich bei diesen Untersuchungen nur sehr hohe, meist millimolare Konzentrationen von Trapidil als wirksam. Die Plasmakonzentration *in vivo* liegt jedoch nach Gabe therapeutischer Dosen von Trapidil nur etwa bei 10 μM (Harder et al., 1996).

Von besonderem Interesse ist die anti-mitogene Wirkung von Trapidil. Mit dieser Wirkung verbindet sich die Hoffnung auf eine Verminderung der Restenose-Rate nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA). In der STARC-Studie wurde die Restenose-Rate durch Trapidil im Vergleich zu Acetylsalicylsäure (ASS) signifikant verringert (Maresta et al., 1994). Einige andere klinische Studien erbrachten in diesem Zusammenhang ebenfalls ein positives Ergebnis mit Trapidil (Nishikawa et al., 1992; Okamoto et al., 1992). Als Erklärung für die anti-mitogene Wirkung wurde eine antagonistische Wirkung von Trapidil auf den PDGF-Rezeptor postuliert. Diese Hypothese konnte allerdings nie belegt werden. Gegen einen PDGF-Antagonismus spricht z.B. die Tatsache, dass Trapidil nicht nur die mitogene Wirkung von PDGF, sondern auch der anderer Mitogene, wie z.B. Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) oder Lipopolysaccharide, hemmen kann (Bönisch et al., 1998).

In dieser Arbeit steht jedoch die anti-ischämische Wirkung von Trapidil im Vordergrund. Direkte Wirkungen auf Variablen des myokardialen Sauerstoffverbrauchs, wie Kontraktilität (Inotropie) oder Herzfrequenz (Chronotropie), sind für eine Substanz, welche zur Behandlung der Myokardischämie eingesetzt wird, von besonderer Bedeutung. *In vitro* wurden positiv inotrope oder chronotrope Effekte am nicht-ischämischen Myokard erst in Konzentrationen $\geq 250 \mu\text{M}$ gefunden, also Konzentrationsbereichen, in denen bereits PDEs gehemmt werden (Bethke et al., 1991). Experimentelle *in vivo*-Untersuchungen an Versuchstieren konnten keine oder nur sehr geringe positiv inotropen oder chronotropen Effekte gemessen werden (Füller et al., 1971). Ebenso kommt es bei Patienten nur nach i.v.-Gabe, nicht aber nach oraler Verabreichung von Trapidil, zu kurzzeitigen inotropen, chronotropen und hypotensiven Effekten. Direkte kardiale Effekte von Trapidil auf das nicht-ischämische Myokard sind aufgrund der Plasmakonzentration nach oraler Gabe therapeutischer Dosen daher nicht anzunehmen.

Anders verhält es sich beim ischämischen Myokard. So konnten Yamaguchi et al. (1983) zeigen, dass die Applikation von Trapidil zu einer Reduktion der Infarktgröße beim Hund führt, gleichzeitig kommt es zu einer Verminderung der Kreatinkinase (CK)-Freisetzung und einer Hemmung der Ischämie-assoziierten ST-Streckenänderung im EKG. In einer früheren Arbeit aus der Arbeitsgruppe, in der auch die vorliegende Arbeit entstand, konnte eine kardioprotektive Wirkung auf ischämische Langendorff-Herzen von Kaninchen mit Trapidil in einer Konzentration von 10 μM gezeigt werden (Schrör et al., 1998). Als möglicher Mechanismus wurde eine Hemmung der Ischämie-induzierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B sowie eine Zunahme der Aktivität der PKA postuliert (Hohlfeld, 1999). Der genaue Mechanismus der anti-ischämischen Wirkung von Trapidil ist jedoch weiterhin unklar.

1.3 Die Proteinkinase A

Bei der Suche nach den zellulären Mechanismen der anti-mitogenen und anti-ischämischen Wirkung von Trapidil wurde in dieser Arbeitsgruppe postuliert, dass Trapidil möglicherweise direkt die Proteinkinase A (PKA; EC 2.7.1.37) aktiviert, da die Substanz in einem Zell-freien System in der Lage war, dass aufgereinigtes Enzym ohne den Zusatz von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) zu aktivieren (Bönisch et al., 1998). Weiterführende pharmakologische Studien legten nahe, dass die Substanz möglicherweise eine Selektivität für die PKA-Isoform II β aufweist (Osinski et al., 1999).

Die reversible Phosphorylierung von Proteinen ist ein regulatorischer Schlüsselmechanismus in eukaryotischen Zellen. Zyklisches AMP, ein intrazellulärer 'second messenger' vieler Hormone und Neurotransmitter, aktiviert die PKA. Die PKA ist dabei der wichtigste Effektor von cAMP in Säugerzellen (Walsh et al., 1968). In Abwesenheit von cAMP ist die PKA ein enzymatisch inaktives heterotetrameres Holoenzym. Dieses Holoenzym besteht aus zwei katalytischen Untereinheiten (C) gebunden an ein Dimer regulatorischer Untereinheiten (R). Zyklisches AMP bindet kooperativ an zwei Bindungsstellen an jeder regulatorischen Untereinheit (Beebe und Corbin, 1986). In der Folge der Bindung von vier Molekülen cAMP dissoziiert das Holoenzym in das Dimer aus regulatorischen Untereinheiten und in zwei freie, enzymatisch aktive katalytische Untereinheiten (schematische Darstellung in Abb. 1-2). Die nun freien katalytischen Untereinheiten phosphorylieren Serin (Ser)- und Threonin (Thr)-Reste spezifischer Substrate. Die cAMP/PKA-Signalkaskade wird über verschiedene

Rezeptoren nach Bindung der jeweiligen Liganden aktiviert. Die Rezeptoren sind G-Proteingekoppelt und vermitteln die Signale über eine Modulation der Adenylatzyklase. Über Rezeptoren, über welche die PKA aktiviert wird, wird eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie z.B. Metabolismus (Krebs und Beavo, 1979), Genregulation (Roesler et al., 1988), Zellwachstum und -teilung (Boynton und Whitfield, 1983), Zelldifferenzierung (Liu, 1982; Schwartz und Rubin, 1983) oder die Leitfähigkeit von Ionenkanälen (Li et al., 1993) reguliert. Einen kleinen Einblick in die vielfältigen, durch PKA modulierten intrazellulären Prozesse gibt die Abbildung 1-3.

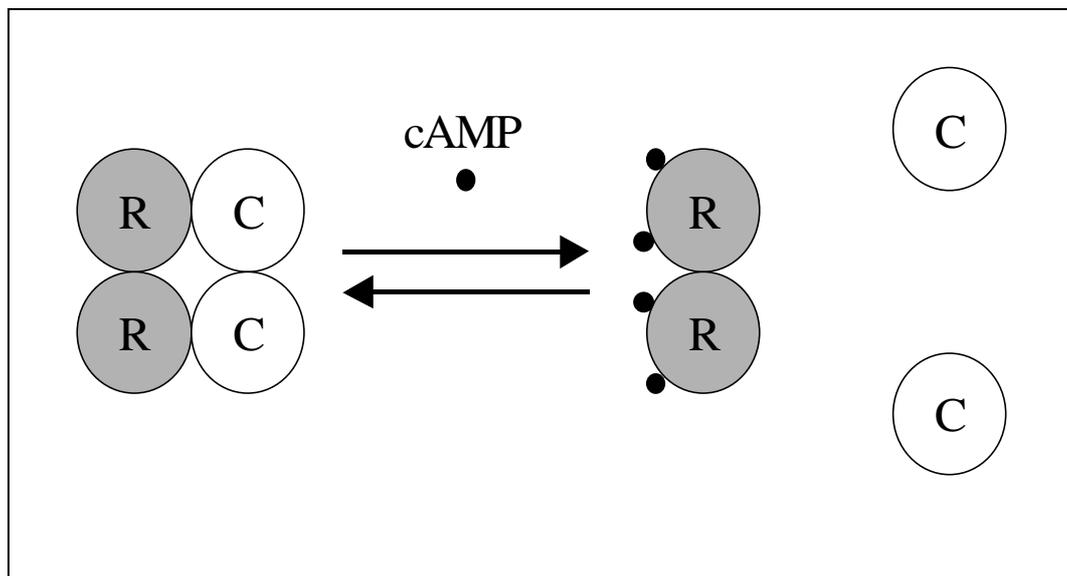


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Aktivierung der PKA durch Bindung von cAMP an die Bindungsstellen der beiden regulatorischen Untereinheiten (R) und nachfolgender Dissoziation des enzymatisch inaktiven Holoenzymkomplexes mit Freisetzung der beiden katalytischen Untereinheiten (C).

Es sind vier Isoformen der R identifiziert worden, zwei RI-Isoformen (RI α und RI β) und zwei RII-Isoformen (RII α und RII β). Die R enthalten am aminoterminalen Ende eine Dimerisierungs-Domäne, also eine Region, die für die Interaktion mit der C verantwortlich ist, und am karboxyterminalen Ende zwei cAMP-Bindungsstellen, bezeichnet mit A und B (Corbin et al., 1978; Døskeland, 1978). Von der C sind drei Isoformen identifiziert worden, C α , C β und C γ . Die nahezu globulären Proteine enthalten Mg/ATP-Bindungsstellen und Substratprotein-Bindungsstellen. Es wird allgemein angenommen, dass die C-Isoformen ohne eine Bevorzugung einer der R-Isoformen mit diesen assoziieren (Maronde, 1993; Taylor et al., 1989). Die C-Isoformen zeigen gleiche physikochemische und kinetische Eigenschaften (Taylor et al., 1990), die Unterscheidung der PKA-Isoformen erfolgt daher über die R-Isoformen.

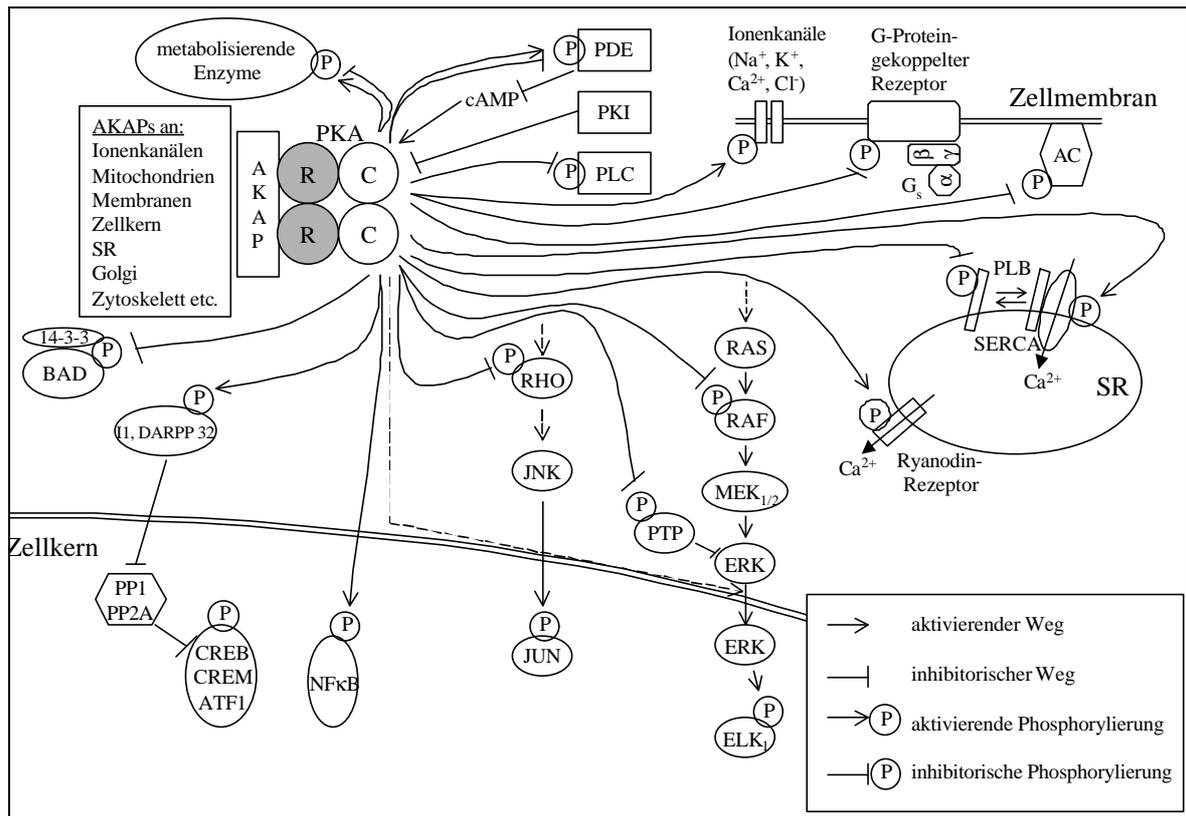


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Vielfalt der von der PKA modulierten intrazellulären Prozesse und Signalkaskaden. Die Modulation umfasst u.a. die Aktivität intrazellulärer Enzyme, Ionenkanäle, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Adenylatzyklase (AC), das sarkoplasmatische Retikulum sowie Signalkaskaden, an deren Ende Transkriptionsfaktoren stehen. Verändert nach Fimia und Sassone-Corsi (2001). AKAP: A-kinase anchoring protein; ATF1: activating transcription factor; CREB: cAMP-responsive-element-binding protein; CREM: cAMP-responsive-element-binding modulator; DARPP32: dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein of apparent M_r 32; ELK: Ets domain protein; ERK: extracellular-signal-regulated kinase; JNK: jun N-terminal protein kinase; I1: inhibitor 1; MAPK: mitogen-activated protein kinase; MEK: MAPK/ERK kinase; NFκB: nuclear factor κB; PDE: Phosphodiesterase; PKI: protein kinase inhibitor; PLB: Phospholamban; PLC: Phospholipase C; PP: Protein-Phosphatase; SERCA: sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase; SR: sarkoplasmatische Retikulum.

Es konnte gezeigt werden, dass die R eine charakteristische Expression in unterschiedlichen Geweben aufweisen. So wird z.B. in Mäusen die $RI\alpha$ im Herzen und im Zentralnervensystem exprimiert, wohingegen die Expression von $RI\beta$ mehr auf Nervengewebe, wie Rückenmark oder Gehirn, beschränkt ist (Cadd und McKnight, 1989). $RII\alpha$ und $RII\beta$ werden beide im Gehirn exprimiert, dennoch unterscheidet sich ihr weiteres Verteilungsmuster. So wird $RII\alpha$ vorwiegend im Herzen, $RII\beta$ in Leber und Fettgewebe exprimiert (Cummings et al., 1996). Viele Veröffentlichungen zeigen, dass spezifische Effekte durch bestimmte PKA-Isoformen vermittelt werden, und dass dies mit der Gewebe-spezifischen Expression und der

intrazellulären Lokalisation der PKA-Isoformen einher geht. Nach dem heutigen Verständnis wird eine Kompartimentierung der PKA durch eine Bindung der R an intrazelluläre Strukturen vermittelt (Scott und McCartney, 1994). Während die PKAI (Holoenzym enthält ein Dimer RI α oder RI β) vornehmlich im Zytosol gelöst vorliegt (Meinkoth et al., 1990), ist die PKAII (Holoenzym enthält ein Dimer RII α oder RII β) hingegen in überwiegendem Maße an intrazelluläre Strukturen und Organelle über die Interaktion mit einem A-Kinase-Anker-Protein (AKAP: A-kinase anchoring protein) gebunden (Colledge und Scott, 1999; Yang et al., 1998). Für die PKAII konnte die Vermittlung spezifischer Effekte von cAMP auf bestimmte zelluläre Funktionen mit Hilfe von bestimmten cAMP-Analoga gezeigt werden. Diese Analoga binden bevorzugt an jeweils eine bestimmte cAMP-Bindungsstelle auf einer bestimmten R. Sie wirken so synergistisch und sind bei entsprechender Kombination in der Lage, nur die PKAI oder PKAII zu aktivieren. Die erste hierzu veröffentlichte Arbeit zeigt, dass die cAMP-vermittelte Regulation der Lipolyse in Adipozyten durch PKAII vermittelt wird, nicht aber durch PKAI (Beebe et al., 1984).

AKAPs binden RII-Untereinheiten der PKA, aber auch Phosphatasen und Phosphodiesterasen, teilweise als Multienzymkomplexe, nahe ihrer Substrate oder an nahegelegenen subzellulären Strukturen. Eine Vielzahl unterschiedlicher AKAPs aus verschiedenen Geweben mit apparenten Molekulargewichten von 15 bis 420 kDa konnten identifiziert werden (Carr et al., 1992). Trotz der großen Diversität der Aminosäure-Sequenzen der AKAPs (Carr und Scott, 1992; Hirsch et al., 1992) zeigen sie gemeinsame strukturelle Eigenschaften. Alle bekannten AKAPs binden an eine gemeinsame Bindungsstelle am N-Terminus der RII-Untereinheiten und binden mit hoher Affinität an RII-Dimere (Luo et al., 1990; Scott et al., 1990). Ebenso konnten auf den verschiedenen AKAPs bestimmte Regionen identifiziert werden, die an die RII binden (Obar et al., 1989; Rubino et al., 1989). Obwohl zwischen diesen Regionen der verschiedenen AKAPs keine signifikanten Übereinstimmungen in der Primärstruktur bestehen, weisen sie doch alle eine einzelne amphipathische Helix auf (Carr et al., 1991). Zusätzlich zu den RII-Bindedomänen weist jedes AKAP eine einzigartige Bindedomäne für die intrazelluläre Lokalisation und damit für die Bindung von PKAII an intrazelluläre Strukturen auf.

Studien von Kranias et al. (1982) ließen vermuten, dass die PKAII mit dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) assoziiert ist. Dies wurde durch immunozytochemische Daten von McCartney et al. (1995) unterstützt. Diese Daten zeigten, dass AKAP100 und ein

großer Teil der myokardialen PKAII am SR lokalisiert zu sein scheinen. Im Lichte dieser Ergebnisse erscheint es wahrscheinlich, dass AKAP100 dazu dient, die PKAII an das SR zu binden um dort Zielproteine zu phosphorylieren.

Bisher konnten weder der genaue Mechanismus der PKA-Aktivierung durch Trapidil noch der Zusammenhang mit den anti-ischämischen Effekten der Substanz ergründet werden. Im besonderen gibt es keine Hinweise auf die zellulären Wirkorte oder die Substrate der PKA in Zusammenhang mit deren Aktivierung durch Trapidil. Auch konnte eine tatsächliche PKA-Isoform-Selektivität von Trapidil bisher nicht nachgewiesen werden.

1.4 Die Rolle von Phospholamban in der Ca^{2+} -Homöostase

Eine der Folgen von Ischämie/Reperfusion (I/R) ist, wie beschrieben, die Störung der Ca^{2+} -Homöostase. Es kommt zu einer Ca^{2+} -Überladung der Zellen, nicht zuletzt aufgrund der Tatsache, dass die Ca^{2+} -Sequestrierung in das SR vermindert ist. Dies wurde für Kardiomyozyten aus I/R-Herzen beschrieben (Przyklenk et al., 1999, Jennings et al., 1964). Aus der Literatur ist bekannt, dass die Phosphorylierung von kardialem Phospholamban (PLB), einem Modulator der Ca^{2+} -Sequestrierung in das SR, bei I/R deutlich reduziert ist im Vergleich zu nicht-ischämischen Herzen (Netticadan et al., 1999; Schoutsen et al., 1989). Phospholamban wurde für die Fragestellung dieser Arbeit interessant, da es sich bei diesem Protein um eines der Hauptsubstrate der PKA in Kardiomyozyten handelt.

Phospholamban ist ein aus 52 Aminosäuren bestehendes Protein, welches in der Membran des SR von Herz und glatter Muskulatur lokalisiert ist. Dieses Protein stellt die Grundlage für den Hauptregulationsmechanismus der SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) dar. Die Bestimmung der vollständigen Primärstruktur von PLB (Fujii et al., 1986; Fujii et al., 1987) zeigte, dass das Monomer eine Größe von 6.08 kDa aufweist. Die Monomere stehen in einem dynamischen Fließgleichgewicht mit PLB-Oligomeren, welche sich als Homopentamere herausstellten (Wegener und Jones, 1984; Jones et al., 1985; Wegener et al., 1986). Die Phosphorylierung von PLB verschiebt das Äquilibrium in Richtung des Pentamers (Cornea et al., 1997), wodurch die Anzahl der Monomere verringert wird. Die Monomere sind im Gegensatz zu den Pentameren potente Inhibitoren der SERCA2a (Autry und Jones, 1997; Kimura et al., 1997). Serin 16 (Ser^{16}) und Threonin 17 (Thr^{17}) wurden als die Aminosäure-Reste identifiziert, die spezifisch durch PKA (Ser^{16}) und Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Kinase (Thr^{17}) phosphoryliert

werden (Fujii et al., 1987; Simmerman et al., 1986). Es wurde bei weiteren Untersuchungen eine dritte Phosphorylierungsstelle, der Aminosäure-Rest Serin 10 (Ser¹⁰), identifiziert. Ser¹⁰ wird über die Proteinkinase C phosphoryliert, die Phosphorylierung scheint jedoch keinen Einfluss auf die Aktivität der SERCA zu haben (Colyer, 1998).

Die 52 Aminosäuren von PLB lassen sich in drei physikalische und funktionelle Domänen aufteilen (Fujii et al., 1986; Simmerman, 1986; Fujii et al., 1987). Die Domäne Ia besteht aus den Aminosäure-Resten 1 – 20, wobei die Aminosäure-Reste 1 – 16 sehr wahrscheinlich eine α -Helix formen (Mortishire-Smith et al., 1995). Die aus den Aminosäure-Resten 21 – 30 bestehende Domäne Ib ist wenig strukturiert, hat polaren Charakter und eine positive Nettoladung. Die Domäne Ia weist eine positive Nettoladung auf, da aber die Reste Ser¹⁶ und Thr¹⁷ phosphoryliert werden können, kann sich die Nettoladung von positiv zu neutral, ja sogar zu negativ verändern. Domäne Ia und Ib stellen den zytoplasmatischen Anteil von PLB dar. Die Domäne II ist eine transmembranäre Domäne und besteht vollständig aus ungeladenen Aminosäure-Resten und liegt in α -helikaler Konformation vor.

Die Modulation der SERCA-Aktivität durch das PLB-Monomer scheint durch eine physikalische Interaktion von PLB mit der SERCA erreicht zu werden (James et al., 1989). Es werden dabei mindestens zwei Kontaktstellen zwischen den Proteinen postuliert, eine in der zytoplasmatischen Domäne, die andere in der transmembranären Domäne von SERCA (Sasaki et al., 1992). Die Interaktion von PLB mit der SERCA resultiert in einer Unterdrückung der Funktion der Ca²⁺-ATPase. So kommt es zu einer Verminderung der Ca²⁺-Sequestrierung aus dem Zytosol. Phosphorylierung von PLB und damit eine Verschiebung des dynamischen Fließgleichgewichts in Richtung des Pentamers führt zu einer Aufhebung der inhibitorischen Wirkung (schematische Darstellung in Abb. 1-4).

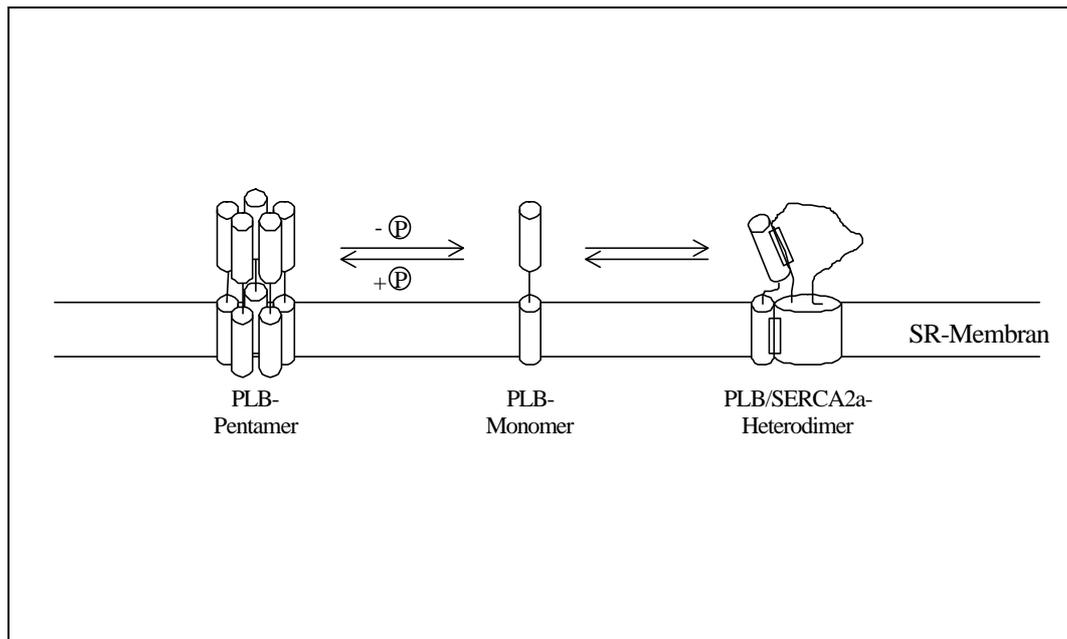


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der reversiblen Inhibition der SERCA2a-Aktivität durch PLB. Dieses Modell beinhaltet die Dissoziation des Homopentamers, welche abhängig vom Grad der Phosphorylierung ist, die Bildung des inhibierten SERCA2a/PLB-Heterodimers und die Dissoziation des Heterodimers.

1.5 Fragestellung

Die grundlegende Fragestellung in dieser Arbeit ist die Frage nach dem anti-ischämischen Wirkmechanismus von Trapidil.

Im ersten Teil der Arbeit sollten dabei am Kaninchen-Herzen folgende Fragen geklärt werden:

1. Ist in diesem I/R-Modell die Anwesenheit von Trapidil während der Reperfusion ausreichend für die kardioprotektive Wirkung der Substanz oder muss die Substanz bereits in der ischämischen Phase in das Myokard gelangen?
2. Liegt der kardioprotektiven Wirkung von Trapidil eine Proteinneusynthese zugrunde oder ist eine solche zumindest in einem gewissen Maße daran beteiligt?
3. Ist Trapidil in der Lage die PLB-Phosphorylierung zu beeinflussen?

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde Trapidil in einem I/R-Modell bei Mäusen eingesetzt. Hier standen folgende Fragen im Vordergrund:

4. Findet sich die kardioprotektive Wirkung von Trapidil auch in einem I/R-Modell mit der Spezies Maus?
5. Kommt es in diesem I/R-Modell unter Trapidil-Gabe zu einer Veränderung der PKA-Expression?

Dem dritten Teil der vorliegenden Arbeit, in dem mit isolierter PKA gearbeitet wurde, lag folgende Fragestellung zugrunde:

6. Ist Trapidil ein direkter Aktivator der PKA und gibt es bei diesem Effekt eine Selektivität für eine PKA-Isoform?

2. Material und Methoden

2.1 Das Langendorff-Modell

2.1.1 Das Kaninchen-Langendorff-Modell

In diesem Modell fanden Herzen von Kaninchen (männliche New Zealand White mit einem Gewicht von 1600 bis 2200 g) Verwendung.

2.1.1.1 Präparation des Kaninchen-Herzens

Einige Minuten vor Beginn der Präparation wurde den Kaninchen Heparin (1000 I.E., Liquemin, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen) i.v. injiziert. Die Kaninchen wurden mittels eines Bolzenschussgerätes (Typ Goldhase, Laubenberger, Murrhardt-Fornsbach) und nachfolgendem Genickschlag getötet und anschließend über die Arteria carotis ca. 30 s entblutet. Es folgte die schnelle Eröffnung des Thorax und die Freilegung des Herzens. Zur Verminderung eines möglichen Hypoxieschadens wurde das Herz während der Präparation konstant mit eisgekühltem, oxigeniertem Krebs-Henseleit-Puffer umspült. In die Aorta wurde proximal zum Aortenbogen eine Kanüle eingebracht über welche das Herz anschließend in der Langendorff-Apparatur retrograd perfundiert wurde. Für die verbleibende Zeit der Präparation wurde die Kanüle zur Perfusion des Herzens mit eisgekühltem Krebs-Henseleit-Puffer genutzt. Es wurde sorgfältig darauf geachtet, dass die Kanüle nur so weit in die Aorta eingeführt wurde, dass die Koronarostien nicht verdeckt wurden oder darüber hinaus die Aortenklappe durchstoßen wurde. Nach dem Abbinden der Venae cavae und anschließender Durchtrennung aller übrigen Gefäße wurde das Herz entnommen und in die Langendorff-Apparatur eingebracht. Die Präparationsdauer, also die Zeit zwischen Tötung der Tiere und retrograder Perfusion des isolierten Herzens in der Langendorff-Apparatur, betrug in allen Fällen weniger als 5 min.

In der Langendorff-Apparatur erfolgte die Perfusion über die in die Aorta eingebrachte Kanüle mit Krebs-Henseleit-Puffer, welcher mittels eines Membranoxygenators (Typ 1500, Dideco, Mirandola, Italien) mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) gesättigt und auf 37°C erwärmt wurde. Die Herzen wurden dabei unter Verwendung einer Schlauchpumpe (Perimax 16 Antipuls, Spetec, Erding) mit 22 ml/min volumenkonstant perfundiert. Sauerstoff- und

Glukose-Versorgung der Herzen waren somit in ausreichendem Maße gewährleistet (Woditsch, 1993). Zur Vermeidung von Gasverlusten nach Oxygenierung des Puffers wurden ausschließlich Tygon[®]-Schläuche verwendet. Die Temperatur des Herzens wurde während des Versuches mittels eines Wärmemantels konstant bei $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ gehalten.

2.1.1.2 Funktionelle Messungen am Kaninchen-Herz

Die Herzen begannen nach Perfusionsbeginn in der Langendorff-Apparatur spontan zu schlagen und schlugen auch während des gesamten Versuches mit Spontanfrequenz. Zur Messung des linksventrikulären Druckes (left ventricular pressure = LVP) wurde ein Latexballon in den linken Ventrikel eingeführt. Hierzu wurde das linke Atrium mit einem Schnitt eröffnet und der Ballon über die Mitralklappe in das Lumen des Ventrikels eingeschoben. Der mit einem Druckwandler (Statham, Gould Medical, CA, USA) verbundene Ballon wurde soweit mit Wasser gefüllt, dass sich ein enddiastolischer Druck (left ventricular enddiastolic pressure = LVEDP) zwischen 3 und 8 mm Hg ergab. Aus dem Signal des linksventrikulären Druckes wurden Herzfrequenz (HF) und erste Ableitung des Druckes, also Geschwindigkeit der Relaxation ($-\text{dp}/\text{dt}$) bzw. Kontraktion ($+\text{dp}/\text{dt}$), errechnet. Der koronare Perfusionsdruck (coronary perfusion pressure = CPP) wurde mittels eines zweiten Druckwandlers (Statham, Gould Medical, CA, USA) kurz vor der in die Aorta eingebundenen Kanüle gemessen. Die Parameter wurden kontinuierlich per MacLab-Computersystem aufgezeichnet und mittels Chart[®]-Software (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australien) ausgewertet.

2.1.1.3 Versuchsprotokoll der Kaninchen-Versuche

Nach der Äquilibration der Herzen (20 – 30 min), also nach Erreichen stabiler kardialer und vaskulärer Parameter, wurde der Zeitpunkt $t = 0$ min festgelegt. Bei Zeitpunkt $t = 30$ min wurden die Herzen entweder für weitere 180 min mit konstantem Volumen von 22 ml/min perfundiert oder es wurde eine globale normothermische Ischämie durch Reduktion des Flusses von 22 ml/min auf 1.2 ml/min induziert ('low-flow'-Ischämie). Die Ischämie wurde 120 min aufrecht erhalten. Anschließend folgte eine Reperfusion unter Wiederherstellung des ursprünglichen Perfusionsvolumens von 22 ml/min für 60 min. Im Anschluss wurde das Herz rasch entnommen, gewogen und in oxygenierten eisgekühlten Krebs-Henseleit-Puffer überführt. Das Herz wurde nun mittels einer Schere in Herzspitze, rechten Ventrikel, Septum

sowie linken Ventrikel Vorderwand und Hinterwand zerteilt. Die jeweiligen Elemente wurden für weitere Untersuchungen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Herzen mit geringer Kontraktionskraft ($\Delta\text{LVP} < 40 \text{ mm Hg}$) sowie Herzen, die anhaltend arrhythmisch waren, wiederholt und anhaltend Kammerflimmern zeigten (beides einhergehend mit stark erhöhten initialen CK-Werten) oder eine spontane Asystolie zeigten, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

In einer ersten Versuchsreihe wurden die Herzen in beiden Gruppen (ischämisch und nicht-ischämisch) entweder mit $10 \mu\text{M}$ Trapidil (UCB, Kerpen) behandelt oder blieben unbehandelt. Der Zusatz von Trapidil erfolgte entweder zum Zeitpunkt $t = 0 \text{ min}$ oder bei einem Teil der ischämischen Herzen mit Beginn der Reperfusion ($t = 150 \text{ min}$). Die Applikation von Trapidil erfolgte über Perfusoren (Perfusor[®]VI, B.Braun, Melsungen) in das Perfusat etwa 3 cm proximal des Herzens, so dass sich eine Endkonzentration von $10 \mu\text{M}$ ergab (bei einer Flussrate von 22 ml/min : 4.4 mM Trapidil perfundiert mit $50 \mu\text{l/min}$; bei einer Flussrate von 1.2 ml/min : $240 \mu\text{M}$ Trapidil perfundiert mit $50 \mu\text{l/min}$).

In einer weiteren Versuchsreihe wurde zu Herzen, die nachfolgend einer Ischämie ausgesetzt wurden, nach Erreichen stabiler kardialer und vaskulärer Parameter $10 \mu\text{M}$ Cycloheximid (Sigma, Deisenhofen) zugesetzt. Die Applikation wurde auf 40 min beschränkt und endete mit Beginn der ischämischen Phase. Cycloheximid wurde ebenfalls über Perfusoren (s.o.) appliziert (bei einer Flussrate von 22 ml/min : 4.4 mM Cycloheximid perfundiert mit $50 \mu\text{l/min}$). Bei einem Teil der Herzen erfolgte nach 10 min Cycloheximid-Gabe die zusätzliche Applikation von $10 \mu\text{M}$ Trapidil für den Rest des Versuchsablaufs.

2.1.2 Das Mäuse-Langendorff-Modell

In diesem Modell fanden Herzen von Mäusen (Stamm NMRI beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht von 24 bis 32 g) Verwendung.

2.1.2.1 Präparation des Mäuse-Herzens

Nach Tötung der Tiere erfolgte die Öffnung des Thorax und die Entnahme des Herzens. Dabei wurde der gesamte Herz-Lungen-Trakt schnell entnommen und in eisgekühlten Krebs-Henseleit-Puffer überführt, wo das Herz während der restlichen Präparationsdauer verblieb.

Lunge, Thymus und Fettgewebe wurden sorgfältig entfernt und die Aorta vor dem ersten Abgang im Aortenbogen (Truncus brachiocephalicus) durchtrennt. Eine Kanüle, über die die spätere retrograde Perfusion erfolgte, wurde in die Aorta eingeführt und durch eine Ligatur fixiert. Das linke Herzohr wurde durch einen Schnitt eröffnet, hier wurde analog zum Kaninchen später ein Ventrikelballon eingeführt. Das Herz wurde anschließend in die Langendorff-Apparatur eingebracht. Die Präparationsdauer, also die Zeit zwischen Öffnung des Thorax und retrograder Perfusion in der Langendorff-Apparatur, betrug in allen Fällen weniger als 7 min.

Im Gegensatz zu der bereits in diesem Labor etablierten Methode des Kaninchen-Langendorff-Herzens wurde für die Langendorff-Versuche mit Mäusen das den physiologischen Bedingungen näherkommende Modell einer Perfusion mit konstantem Druck gewählt. Die notwendige Langendorff-Apparatur wurde im Rahmen dieser Arbeit aufgebaut. Über ein System kommunizierender Röhren wurde über dem Herzen in einer hierfür konstruierten Glas-Apparatur konstant ein Druck von 80 mm Hg (entspricht 105 cm Wassersäule) erzeugt. Über einen Wärmemantel wurde der in der Säule befindliche Krebs-Henseleit-Puffer, der für die Mäuse leicht modifiziert wurde, erwärmt. Die Modifizierungen des Puffers betrafen den Ca^{2+} -Gehalt, der bei den Mäusen von 2.5 mM auf 2 mM verringert wurde, die höhere Glukose-Konzentration (8.3 mM statt 5 mM) und den Zusatz von Pyruvat als weiteren Energieträger neben Glukose. Der Puffer wurde dabei in der Säule mit Carbogen begast. Nach Einbringen des Herzens in die Langendorff-Apparatur wurde zunächst der Ventrikelballon im Lumen des linken Ventrikels plaziert. Hierbei wurde analog zu den Kaninchen-Versuchen vorgegangen. Anschließend wurde eine Schrittmacher-Elektrode, bestehend aus 2 Platin-Iridium-Drähten (fixer Abstand 1 mm), in das rechte Atrium eingestochen und die Herzen mittels eines Pulsgenerators auf eine Frequenz von 500 Schläge/min eingestellt (Pulslänge 4 ms, max. 2.5 V). Zur Kontraktion des Ventrikels kam es also in diesem System durch eine Weiterleitung der Erregung über den AV-Knoten auf die Ventrikel. Mittels eines Wärmemantels wurde die Temperatur des Herzens während des Versuches konstant bei $37.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ gehalten.

2.1.2.2 Funktionelle Messungen am Mäuse-Herz

Der in das Lumen des linken Ventrikels eingeführte und mit einem Druckwandler (Combitrans, B.Braun, Melsungen) verbundene Ballon wurde entsprechend der Kaninchen-

Versuche soweit mit Wasser gefüllt, dass sich ein LVEDP von 3 – 8 mm Hg ergab. Ebenso konnten die bereits unter 2.1.1.2 beschriebenen Ableitungen von den gemessenen LVP-Werten gewonnen werden ($\pm dp/dt$). Im Gegensatz zu den funktionellen Messungen am Kaninchen-Herzen war die Herzfrequenz bei den Mäusen vorgegeben (500 Schläge/min). Als Parameter für die Kontraktion bzw. Dilatation der Koronarien diente in diesem druckkonstanten System der Durchfluss durch diese. Die koronare Flussrate wurde mittels eines Flussmessgerätes (MDL 401, Skalar Medical B.V., Delft, Niederlande) ermittelt. Auch bei den Mäuse-Versuchen wurden die Parameter kontinuierlich per MacLab-Computersystem aufgezeichnet und mittels Chart[®]-Software (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australien) ausgewertet.

2.1.2.3 Versuchsprotokoll der Mäuse-Versuche

Auch bei dem Maus-Modell handelt es sich um ein Ischämie/Reperfusion (I/R)-Modell. Im Gegensatz zum Kaninchen-Modell wurde jedoch hier der Fluss durch die Koronarien zur Generation einer Ischämie auf 0 reduziert (globale 'zero-flow'-Ischämie). Dies geschah durch Unterbrechung des Zuflusses direkt oberhalb des Herzens. Mit Erreichen stabiler kardialer und vaskulärer Parameter nach ca. 25 – 35 min wurde der Zeitpunkt $t = 0$ min definiert. Die Einleitung der Ischämie erfolgte unmittelbar nach diesem Zeitpunkt. Während der Ischämie wurde die Temperatur über Eintauchen des Herzens in ein kleines Gefäß mit unbegastem Krebs-Henseleit-Puffer aufrecht erhalten. So wurde eine Auskühlung des Herzens durch Verdunstungskälte vermieden. Anschließend erfolgte durch Wiederherstellung des Flusses eine druckkonstante Reperfusion entsprechend der anfänglichen Bedingungen für 45 min. Nach dieser Zeit wurde das Herz rasch entnommen, gewogen und für weitere Untersuchungen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Herzen, die eine übermäßige Flussrate zeigten (nach 5 min > 5 ml/min, gewöhnlich auf einen Riss in der Aorta zurückzuführen), Herzen mit extrem hohen initialen CK-Werten sowie Herzen mit geringer Kontraktionskraft ($\Delta\text{LVP} < 50$ mm Hg) wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

Zur Etablierung des Modells wurden zunächst unterschiedliche Ischämie-Zeiten (30, 35, 40, 50 und 60 min) mit anschließender 45minütiger Reperfusion und deren Effekte auf kardiale und vaskuläre Parameter sowie die CK-Freisetzung untersucht. Als weiterer Parameter zur Bestimmung des Ischämie-Schadens wurde eine Färbung der Herzen mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), wie unter 2.4 beschrieben, durchgeführt.

Aufgrund der Ergebnisse aus dieser Versuchsreihe wurde in nachfolgenden Versuchen nach dem Erreichen stabiler hämodynamischer Parameter der Fluss für 60 min unterbrochen (60minütige globale 'zero-flow'-Ischämie) mit anschließender 45minütiger Reperfusion oder der Fluss wurde für 105 min unter unveränderten Bedingungen aufrecht erhalten. Beide Gruppen verblieben entweder unbehandelt oder es erfolgte die Behandlung mit 10 μM oder 100 μM Trapidil. Dabei war das Trapidil bereits mit Versuchsbeginn im Krebs-Henseleit-Puffer in der jeweiligen Konzentration vorhanden.

2.2 Messungen der Kreatinkinase

Die Kreatinkinase ist ein sehr gut etablierter Marker für den Verlauf und das Ausmaß eines ischämischen Schadens. Dieses intrazelluläre Enzym wird nur bei einem Verlust der Membranintegrität aus der Zelle freigesetzt. Die Messung erfolgte im Rahmen dieser Arbeit in den Langendorff-Effluaten. Bei den Kaninchen wurden die Effluate zwischen den jeweiligen Messzeitpunkten gesammelt und anschließend hiervon 1 ml zur Bestimmung der CK-Freisetzung abgenommen. Die Werte entsprechen somit Mittelwerten für den jeweiligen Zeitraum zwischen zwei Messzeitpunkten. Für die Bestimmung des CK-Wertes am Ende der Reperfusion entspricht das der Sammlung des Effluats vom Zeitpunkt $t = 180$ min bis $t = 210$ min. Bei den Mäusen wurde zu den jeweiligen Messzeitpunkten 1 ml Effluat direkt nach Austritt aus dem Herzen zur Bestimmung der CK-Freisetzung abgenommen. Die Werte entsprechen also der CK-Freisetzung zum jeweiligen Zeitpunkt.

Die Messung der CK-Aktivität erfolgte mittels eines Kits (#1087533, Roche Diagnostics, Mannheim) bei 25°C nach den Empfehlungen des Herstellers. Es handelt sich hierbei um einen photometrischen Test, der auf der Umsetzung von NADP^+ zu $\text{NADPH} + \text{H}^+$ beruht. Die photometrische Messung fand bei 340 nm statt. Trapidil und Cycloheximid nahmen in den eingesetzten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Ergebnisse des Assays.

2.3 Messung von 6-oxo-PGF_{1 α}

Es besteht nicht die Möglichkeit, Prostacyclin (PGI_2) direkt im Langendorff-Effluat zu messen, da der reaktive Enoether innerhalb weniger Minuten durch nicht-enzymatisch Hydrolyse vollständig in 6-oxo-PGF_{1 α} umgesetzt wird. Die Produktion von PGI_2 in den Kaninchen-Herzen wurde daher anhand des stabilen Abbauproduktes 6-oxo-PGF_{1 α} im Effluat

ermittelt. Die Quantifizierung von 6-oxo-PGF_{1α} erfolgte mittels eines Radio-Immuno-Assay (RIA) im RIA-Labor des Instituts für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durch Frau Irmhild Rüter. Dabei wurde ein in diesem Labor hergestelltes 6-oxo-PGF_{1α}-Antiserum verwendet (Latta, 1986). Trapidil zeigte in den eingesetzten Konzentrationen keinerlei Einfluss auf die Ergebnisse des RIA.

2.4 Bestimmung der Infarktgröße mit Triphenyltetrazoliumchlorid

TTC ist eine Substanz, welche vitales Gewebe tief rot färbt, während nekrotisches Gewebe ungefärbt bleibt und hell erscheint. Dieser Effekt beruht darauf, dass TTC durch eine mitochondriale Dehydrogenase in einen roten Farbstoff umgesetzt wird. Diese Dehydrogenase ist in den nekrotischen Kardiomyozyten nach der Reperfusion bereits ausgewaschen, weshalb eine Farbreaktion ausbleibt.

Mittels einer Injektionsspritze wurde am Versuchsende 0.75%ige TTC-Lösung direkt vor das noch in der Langendorff-Apparatur befindliche Herz infundiert. Unter dem Einfluss von TTC erfolgte innerhalb weniger Sekunden ein Herzstillstand. Sobald das Herz eine deutliche Rotfärbung aufwies (nach ca. 2 min), wurde es aus der Apparatur rasch entnommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Nach 24 – 48 h Lagerung wurden von den Herzen in noch gefrorenem Zustand Horizontalschnitte angefertigt. Die Schnitte hatten eine Dicke von ca. 1 mm. Die so gewonnenen Scheiben wurden zur Fixierung über Nacht in 2 % (v/v) Formalin bei 4°C gelagert. Die Herz-Querschnitte wurden mittels eines Flachbettscanners eingescannt (Software Paint Shop Pro 4.12, JASC, Eden Prairie, USA) und es folgte die Vermessung der nekrotischen und vitalen Bereiche (Software Skaletti 2.5, Conrad Electronic, Hirschau).

2.5 Western-Blot

2.5.1 Proteingewinnung aus Herzgewebe

Zur Gewinnung von Proteinen wurden die Kaninchen- bzw. Mäuse-Herzen aus den Langendorff-Versuchen verwendet. Bei den Kaninchen-Herzen wurden Stücke der Vorderwand des linken Ventrikels zunächst mit Hilfe einer Schere zerkleinert und anschließend in RIPA-Puffer (200 mg Gewebe/ml RIPA) auf Eis mittels eines Ultra-Turrax

(IKA, Staufen) homogenisiert. Bei den Mäuse-Herzen wurde zur Homogenisierung des Gewebes ein anderes Verfahren gewählt. Diese wurden mit flüssigem Stickstoff gekühlt, *in toto* in ein ebenfalls in flüssigem Stickstoff gekühltes Teflongefäß mit einer frei beweglichen Stahlkugel gegeben und in einem Mikro-Dismembrator (B.Braun, Melsungen) homogenisiert. Das entstehende feine Pulver wurde umgehend in eisgekühlten RIPA-Puffer (1 ml pro Herz, entspricht ca. 140 – 180 mg Gewebe) überführt. Das weitere Protokoll war bei Mäusen und Kaninchen identisch.

Die Lysate wurden unmittelbar nach der Homogenisierung für 3 min bei 95°C erhitzt und nachfolgend für 1 min bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden Aliquots zur Proteinbestimmung (siehe 2.6) entnommen und auf Eis bis zur unmittelbar im Anschluss stattfindenden Analyse gelagert. Der restliche Überstand wurde direkt in das gleiche Volumen 2xLämmli gegeben, für 10 min bei 95°C erhitzt und bis zur weiteren Verwendung aliquotiert und bei –80°C gelagert.

2.5.2 Auftrennung der Proteine

Die Auftrennung und Analyse der so gewonnenen Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE). Es wurden dabei diskontinuierliche Gele entsprechend der Methode von Fling und Gregerson (1986) verwendet. Die Acrylamidkonzentration im Sammelgel war 4%, die Konzentration im Trenngel 12% bzw. 15%. Aliquots von 1 µg (Kaninchen) bzw. 10 µg (Mäuse) Protein wurden bei 200 V getrennt. Die Auftrennung erfolgte in einem Lauf-Puffer. Nach der Auftrennung wurden die Proteine auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Immobilon-P, Millipore, Bedford, USA) übertragen. Die PVDF-Membran wurde zunächst durch Inkubation in Methanol aktiviert (3 min) und anschließend für 10 min in Blot-Puffer inkubiert. Der Transfer erfolgte in einer 'Semi-Dry'-Blot-Apparatur (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad, München) bei 12 V für 30 min. Nach dem Blot wurden die Membranen für ≥ 60 min bei RT in TBS-TM inkubiert. Unspezifische Bindungen eines Antikörpers an die Membranen wurden auf diese Weise unterbunden.

2.5.3 Detektion spezifischer Proteine

Mit spezifischen Antikörpern wurden die auf den PVDF-Membranen immobilisierten Proteine detektiert. Eine Liste der verwendeten Antikörper sowie deren Verdünnungen findet sich in Tabelle 2-1. Die Inkubation erfolgte in allen Fällen bei 4°C über Nacht. Nachfolgend wurden die Membranen gewaschen (3 x 15 min in TBS-T). Es folgte die Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (je nach Quelle des Primärantikörpers anti-mouse oder anti-rabbit, Verdünnung jeweils 1:3000 in TBS-TM) für 45 min bei RT. Nach einem weiteren Waschschrift (3 x 15 min in TBS-T) folgte eine Inkubation mit ECL (enhanced chemiluminescence)-Reagenz (Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien). Die an den Sekundärantikörpern befindliche Peroxidase vermittelte eine Oxidation des im ECL-Reagenz enthaltenen Luminols und die resultierende Lichtemission konnte mittels Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien) detektiert werden.

2.5.4 'stripping' der PVDF-Membranen

Bei Membranen mit Kaninchen-Proben, die auf die spezifische Phosphorylierung von PLB an Ser¹⁶ untersucht wurden (Antikörper PLB-PS16), wurde ein besonderes Verfahren angewendet. Um einen direkten Vergleich der Menge an phosphoryliertem PLB mit der Gesamtmenge von PLB zu haben, wurden die Membranen nach der Belichtung des Röntgenfilms noch einmal vom Primärantikörper PLB-PS16 befreit und anschließend mit dem Antikörper PLB-A1 inkubiert. Hierzu wurden die Membranen nach der Belichtung des Röntgenfilms (nach PLB-PS16-Behandlung) 2 x 15 min in TBS-T gewaschen. Jede Membran wurde im Anschluss in 50 ml 'stripping'-Puffer gegeben und in diesem für 30 min bei 60°C unter ständiger Umspülung der Membran inkubiert (Inkubator OV I, Biometra, Göttingen). Nachfolgend wurden die Membranen 2 x 15 min in je 100 ml TBS-T gewaschen. Die Membranen wurden nun noch einmal für ≥ 60 min bei RT in TBS-TM inkubiert. Anschließend konnte erneut mit einem Primärantikörper, hier mit PLB-A1, inkubiert werden. Die weitere Behandlung erfolgte wie unter 2.5.2 beschrieben.

Name	Antigen	Quelle	Verdünnung	Hersteller	Katalog -Nr.
PKAI β reg	PKA regulatorische UE I β	polyklonal Kaninchen	1:1000 in TBS-TM	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	#sc-907
PKAII α reg	PKA regulatorische UE II α	polyklonal Kaninchen	1:1000 in TBS-TM	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	#sc-908
PKA α cat	PKA katalytische UE α	polyklonal Kaninchen	1:500 in TBS-TM	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	#sc-903
PKA β cat	PKA katalytische UE β	polyklonal Kaninchen	1:1000 in TBS-TM	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	#sc-904
PKA γ cat	PKA katalytische UE γ	polyklonal Kaninchen	1:1000 in TBS-TM	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	#sc-905
PKA RI α	PKA regulatorische UE I α	monoklonal Maus	1:1000 in TBS-TM	BD Biosciences, Heidelberg	#P53620
PKA RII β	PKA regulatorische UE II β	monoklonal Maus	1:1000 in TBS-TM	BD Biosciences, Heidelberg	#P54720
PLB-A1	Phospholamban gesamt	monoklonal Maus	1:10000 in TBS-TM	Cyclacel, Leeds, Großbritannien	#010-14
PLB-PS16	Phospholamban, phosphoryliert an Ser ¹⁶	polyklonal Kaninchen	1:10000 in TBS-TM	Cyclacel, Leeds, Großbritannien	#010-12

Tabelle 2-1: Liste der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper. UE: Untereinheit.

2.5.5 Prüfung auf gleichmäßige Beladung

Nach der Belichtung des Röntgenfilms wurden die Membranen noch einmal etwa 15 min in TBS-T gewaschen und anschließend für 10 min mit Amido-Schwarz-Lösung inkubiert. Amido-Schwarz bindet irreversibel an die auf der Membran befindlichen Proteine. Für den unter 2.5.4 dargestellten Sonderfall erfolgte die Färbung erst nach der Inkubation mit PLB-A1. Es folgte eine Entfärbung (Amido-Schwarz-Entfärbelösung) für 10 min. Nach Entfernung des überschüssigen Farbstoffes wurden die Proteinbanden sichtbar. So konnte eine gleichmäßige Proteinbeladung und somit eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet werden.

2.5.6 Densitometrische Auswertung der Röntgenfilme

Die densitometrische Auswertung der Western-Blots erfolgte mit einem Komplettsystem der Firma Biometra (Software ScanPack 2.0, Biometra, Göttingen). Die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Gele wurde durch eine als Standard definierte Probe gewährleistet. Für den unter 2.5.4 dargestellten Sonderfall wurden die Ergebnisse als Ratio Ser¹⁶-phosphoryliertes PLB/Gesamt-PLB angegeben.

2.6 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels des DC Protein Assay (#500-0112, Bio-Rad, München) nach den Empfehlungen des Herstellers. Das Prinzip dieses Assay beruht auf dem Lowry-Assay (Lowry et al., 1951). Die Erstellung der Eichkurve erfolgte mit Rinderserumalbumin. Die photometrische Auswertung wurde mit einem ELISA-reader (Microplate Reader Model 550, Bio-Rad, München) bei einer Wellenlänge von 595 nm durchgeführt.

2.7 Bestimmung der PKA-Aktivität

Bestimmungen der PKA-Aktivität wurden mit einem Kit (#539484, Calbiochem, San Diego, USA) durchgeführt. Das Prinzip dieses nicht-radioaktiven Assays beruht darauf, dass ein immobilisiertes PKA-Pseudosubstrat (Peptid der Sequenz RFARKGSLRQKNV) durch aktivierte PKA an Serin (in der angegebenen Sequenz unterstrichen) phosphoryliert wird. An

das phosphorylierte Serin kann ein biotinylierter spezifischer Antikörper binden. An das Biotin bindet seinerseits in einem weiteren Schritt eine Streptavidin-gekoppelte Peroxidase. Die Peroxidase setzt anschließend o-Phenylendiamin in einen detektierbaren Farbstoff um. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich an isolierter PKA in einem zellfreien System durchgeführt. Die Durchführung der Versuche erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers. Die Inkubationszeit der Lösung auf der Pseudosubstrat-beschichteten Platte betrug dabei 15 min (Empfehlung des Herstellers: 5 – 20 min). Die photometrische Auswertung wurde mit einem ELISA-reader (Microplate Reader Model 550, Bio-Rad, München) bei einer Wellenlänge von 490 nm durchgeführt.

In Versuchen mit isolierter PKA von Sigma (#P5511, Sigma, Deisenhofen) wurden 50 ng dieser PKA pro Einzelprobe (130 μ l) eingesetzt. Eine Konzentrationsangabe ist aufgrund der mangelhaften Angaben von Sigma nicht möglich. Diese Menge PKA wurde bereits bei früheren Untersuchungen eingesetzt (z.B. Bönisch et al., 1998). In weiteren Versuchen wurden rekombinante PKA-Untereinheiten eingesetzt. Diese wurden freundlicherweise von PD Dr. Herberg (Institut für Physiologische Chemie, Ruhr-Universität Bochum) zur Verfügung gestellt. Die rekombinanten Untereinheiten waren vollständig cAMP-frei, das heisst, sie enthielten kein freies sowie kein proteingebundenes cAMP. Es kamen eine murine katalytische Untereinheit (C α) sowie 3 unterschiedliche regulatorische Untereinheiten (bovine RI α , humane RII α und humane RII β) zum Einsatz. Zunächst wurde aus jeder dieser rekombinanten R mit C α ein PKA-Holoenzym geformt (siehe 2.8). Von diesem PKA-Holoenzym wurden 10 nM (entspricht 20 nM C α) in dem Assay eingesetzt.

Zur Untersuchung des Einflusses von Trapidil auf die PKA wurde die Substanz in diesem Assay in einer Konzentration 100 μ M eingesetzt, sowohl bei der PKA der Firma Sigma als auch bei der Untersuchung der Holoenzyme aus rekombinanten Untereinheiten. Wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, betrug die Konzentration von cAMP 2 μ M. Diese cAMP-Konzentration liegt in der Größenordnung physiologischer Konzentrationen in myokardialem Gewebe (z.B. Klug et al., 1984). Da dieser Assay auch zur Detektion von PKC geeignet ist, wurde bei der Sigma-PKA eine Beteiligung von PKC an der gemessenen Kinase-Aktivität durch die Zugabe von 1 μ M PKI in einem weiteren Versuchsansatz ausgeschlossen.

2.8 Bildung von PKA-Holoenzymen aus rekombinanten Untereinheiten

Zur Bildung eines PKA-Holoenzym aus rekombinanten Untereinheiten wurde jeweils eine R (RI α , RII α oder RII β) mit der murinen C α in einem Mg/ATP-Puffer im molaren Verhältnis 1.2 : 1 (R : C) gemischt und für 60 min bei 4°C inkubiert. Dies erfolgte jeweils direkt vor dem Einsatz des Holoenzym im PKA-Assay (siehe 2.7). Es wurde bei allen Schritten auf eine sorgfältige Kühlung geachtet. Die Vollständigkeit der Holoenzymbildung konnte mittels des PKA-Assays überprüft werden. Alle in dieser Arbeit aufgeführten Versuche zeigten eine sehr niedrige Grundaktivität und somit eine nahezu vollständige Holoenzymbildung.

2.9 Lösungen und Puffer

Amido-Schwarz-Lösung

0.1% (w/v) Amido-Schwarz, 25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure.

Amido-Schwarz-Entfärbelösung

25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure.

Blot-Puffer

190 mM Glycin, 25 mM Tris, 20% (v/v) Methanol.

Krebs-Henseleit-Puffer (Kaninchen)

118.1 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 5 mM Glukose, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄.

Krebs-Henseleit-Puffer (Mäuse)

118.1 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 8.3 mM Glukose, 4.7 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM Pyruvat, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄.

2xLämmli-Puffer

125 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7.0, 100 mM DL-Dithiothreitol, 20% (v/v) Glycerin, 4% (w/v) SDS, 0.002% Bromphenolblau.

Lauf-Puffer

190 mM Glycin, 25 mM Tris, 0.1% (w/v) SDS.

Mg/ATP-Puffer

5 mM MgCl₂, 1 mM ATP.

RIPA-Puffer

150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 1% (v/v) NP40 (IGEPAL CA-630), 0.5% (w/v) Desoxycholat (DOC), 0.1% (w/v) SDS, 5 µl Protease-Inhibitor-Mix (#P8340, Sigma, Deisenhofen)/100 mg Gewebe.

'stripping'-Puffer

100 mM β-Mercaptoethanol, 62.5 mM Tris/HCl pH 6.8, 2% (w/v) SDS.

TBS-T

150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7.4, 0.1% (v/v) Tween20.

TBS-TM

150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7.4, 0.1% (v/v) Tween20, 5% (w/v) Milchpulver.

TTC-Lösung

200 mM Tris/HCl pH 7.8, 150 mM NaCl, 0.75% (w/v) TTC.

Alle Lösungen und Puffer wurden mit Aqua dest. angesetzt. Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in bester verfügbarer Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.10 Statistik

Alle Messdaten sind angegeben als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus n unabhängigen Experimenten. Statistische Analysen wurden mit dem Student's t-test bzw. one-way ANOVA mit nachfolgendem Bonferroni's Multiple Comparison Test durchgeführt, p -Werte < 0.05 wurden als signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Versuche nach Langendorff mit Kaninchen

An diesem bereits in dieser Arbeitsgruppe etablierten Modell der Ischämie/Reperfusion am Kaninchen-Herzen sollte zunächst die beschriebene kardioprotektive Wirkung von Trapidil (Schrör et al., 1998) verifiziert werden. Weitere Untersuchungen, die den Wirkmechanismus von Trapidil aufklären sollten, folgten am gleichen Modell. Hierzu erfolgten zunächst grundlegende Versuche, bei denen Trapidil nach der Äquilibrierung der Herzen über den gesamten Versuchszeitraum zugesetzt wurde. Gewebe dieser Herzen wurde für Western-Blots verwendet. In einer sich anschließenden Versuchsreihe wurde Trapidil bei I/R-Herzen nur während der Reperfusion gegeben. In einer dritten Versuchsreihe wurde bei I/R-Herzen Cycloheximid appliziert mit und ohne Trapidil-Zusatz.

3.1.1 Trapidil-Applikation über den gesamten Versuchszeitraum

Die Trapidil-Applikation erfolgte in dieser Versuchsreihe bei ischämischen und nicht-ischämischen Herzen vom Zeitpunkt $t = 0$ min an. Weiterhin gab es ischämische und nicht-ischämische Herzen, die keine Behandlung mit Trapidil erfuhren. Die Endkonzentration von Trapidil betrug in allen Versuchsreihen mit Kaninchen-Herzen $10 \mu\text{M}$. Zum Zeitpunkt $t = 30$ min, welcher bei ischämischen Herzen einer Messung direkt vor Beginn der ischämischen Phase entspricht, zeigten die Parameter HF, CPP, ΔLVP (aktiv entwickelter linksventrikulärer Druck), LVEDP, $-\text{dp}/\text{dt}$ und $+\text{dp}/\text{dt}$ keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Der CPP zeigte im Laufe des Versuchsprotokolls einen zeitabhängigen Anstieg der Werte in allen Gruppen unabhängig von Ischämie und Trapidil-Applikation. Ebenso zeigte sich eine zeitabhängige Abnahme der HF in allen Versuchsgruppen. Dabei war zu beobachten, dass die HF-Werte der ischämischen Herzen am Ende der Reperfusion ($t = 210$ min) weniger deutlich abgenommen haben gegenüber den HF-Werten der nicht-ischämischen Herzen. Dies war jedoch unabhängig von der Trapidil-Applikation. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass Trapidil keinen Einfluss auf die Parameter HF, CPP, ΔLVP , LVEDP, $-\text{dp}/\text{dt}$ und $+\text{dp}/\text{dt}$ in nicht-ischämischen Herzen hatte. Mit Einsetzen der Ischämie kam es zu einer substantiellen Abnahme der Werte von HF, CPP und ΔLVP . Im Laufe der Reperfusion zeigten HF und CPP die erwähnten Änderungen, ΔLVP

zeigte eine nahezu vollständige Erholung zum Zeitpunkt $t = 210$ min, hier zeigte sich ebenfalls keine Abhängigkeit von der Trapidil-Applikation (Tabelle 3-1).

Parameter	Kontrolle 30 min / 210 min	10 μ M TPD 30 min / 210 min	I/R 30 min / 210 min	I/R + 10 μ M TPD 30 min / 210 min
Δ LVP (mm Hg)	75 \pm 3 / 75 \pm 3	79 \pm 4 / 77 \pm 5	67 \pm 5 / 58 \pm 7	72 \pm 8 / 67 \pm 9
CPP (mm Hg)	30 \pm 1 / 49 \pm 7*	29 \pm 2 / 52 \pm 4*	28 \pm 3 / 52 \pm 5*	29 \pm 1 / 51 \pm 4*
HF (Schläge/min)	189 \pm 10 / 158 \pm 7	177 \pm 5 / 153 \pm 4	184 \pm 7 / 172 \pm 6	176 \pm 6 / 171 \pm 8

Tabelle 3-1: Kardiale und koronare Funktionen der Kaninchen-Herzen zu den Zeitpunkten $t = 30$ min und $t = 210$ min bei den unterschiedlichen Versuchsbedingungen. TPD: Trapidil. Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 9 – 14 Herzen pro Gruppe. * $p < 0.05$ 30 min vs. 210min.

Im Vergleich zu den in Tabelle 3-1 aufgeführten, nicht durch Trapidil beeinflussten Parametern zeigte sich ein anderes Bild beim LVEDP. Der LVEDP nahm im Verlauf der Ischämie deutlich zu und zeigte am Ende der Reperfusion eine immer noch gegenüber dem Ausgangswert deutlich erhöhte Kontraktur des Myokards an. Die Zugabe von 10 μ M Trapidil konnte diese Kontraktur weitgehend aufheben. In den Herzen der Gruppe I/R + 10 μ M Trapidil kam es am Ende der Ischämie zu den Zeitpunkten $t = 120$ min und $t = 149$ min zu einer signifikanten Reduktion des LVEDP um 72% bzw. 61% im Vergleich zu den unbehandelten I/R-Herzen. Mit Beginn der Reperfusion (Zeitpunkt $t = 151$ min) zeigte sich weiterhin eine um 70% signifikant verringerte Kontraktur. Im Verlaufe der Reperfusion näherte sich der LVEDP der Trapidil-behandelten Herzen an den Kontrollwert an und blieb somit immer noch deutlich unter den Werten für unbehandelte I/R-Herzen (Abb. 3-1).

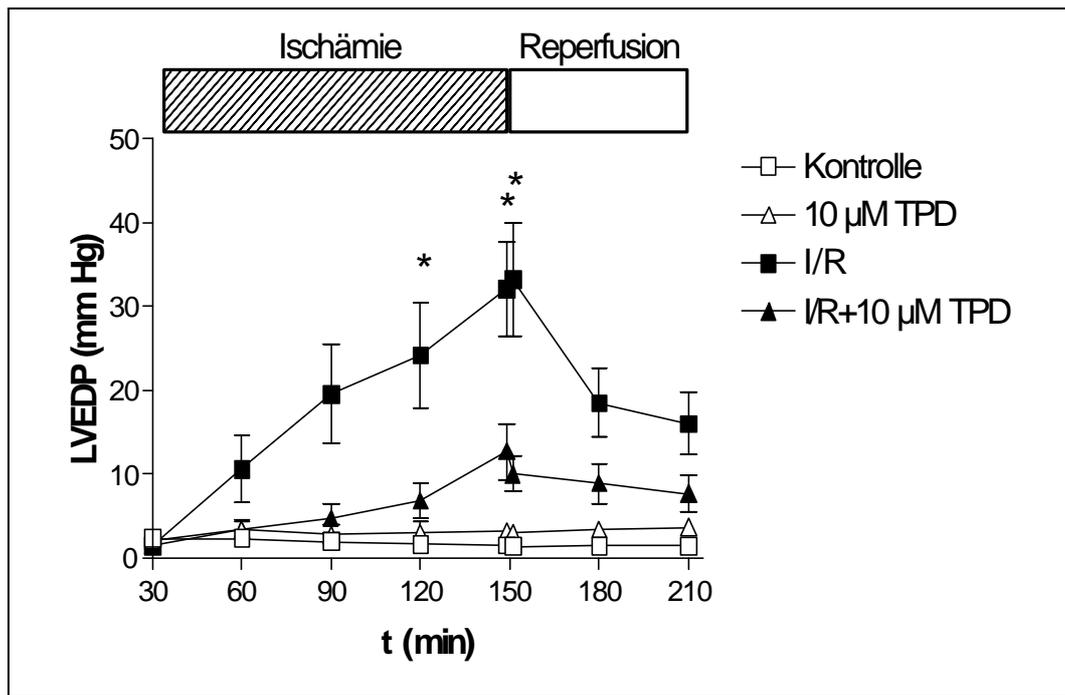


Abb. 3-1: Zeitlicher Verlauf des LVEDP bei ischämischen (geschlossene Symbole) und nicht-ischämischen (offene Symbole) Kaninchen-Herzen mit (Dreiecke) und ohne (Quadrate) 10 µM Trapidil (TPD). Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 9 – 14 Herzen pro Gruppe. * $p < 0.05$ I/R + 10 µM TPD vs. I/R.

Ebenso zeigte sich eine Beeinflussung der ersten Ableitung des linksventrikulären Druckes, also der Relaxationsgeschwindigkeit ($-dp/dt$) und der Kontraktionsgeschwindigkeit ($+dp/dt$) des Ventrikels. Mit einsetzender Ischämie zeigt sich auch für diese Werte eine substantielle Abnahme. Betrachtet man die Relaxationsgeschwindigkeit, so zeigte sich bei den I/R-Herzen am Ende der Reperfusion eine signifikante Abnahme um 37% gegenüber Kontrolle. Durch Zugabe von Trapidil konnte diese Reduktion der Relaxationsgeschwindigkeit praktisch vollständig aufgehoben werden und die Werte erreichten das Niveau der Kontrolle (Abb. 3-2). Bei der Kontraktionsgeschwindigkeit zeigte sich ein ähnliches Bild. Hier führte I/R zu einer deutlichen, aber nicht signifikanten Abnahme der Werte am Ende der Reperfusion. Bei Applikation von Trapidil bei I/R kam es zu einer signifikanten Zunahme der Kontraktionsgeschwindigkeit, welche das Niveau der Kontroll-Herzen erreichte (Abb. 3-3).

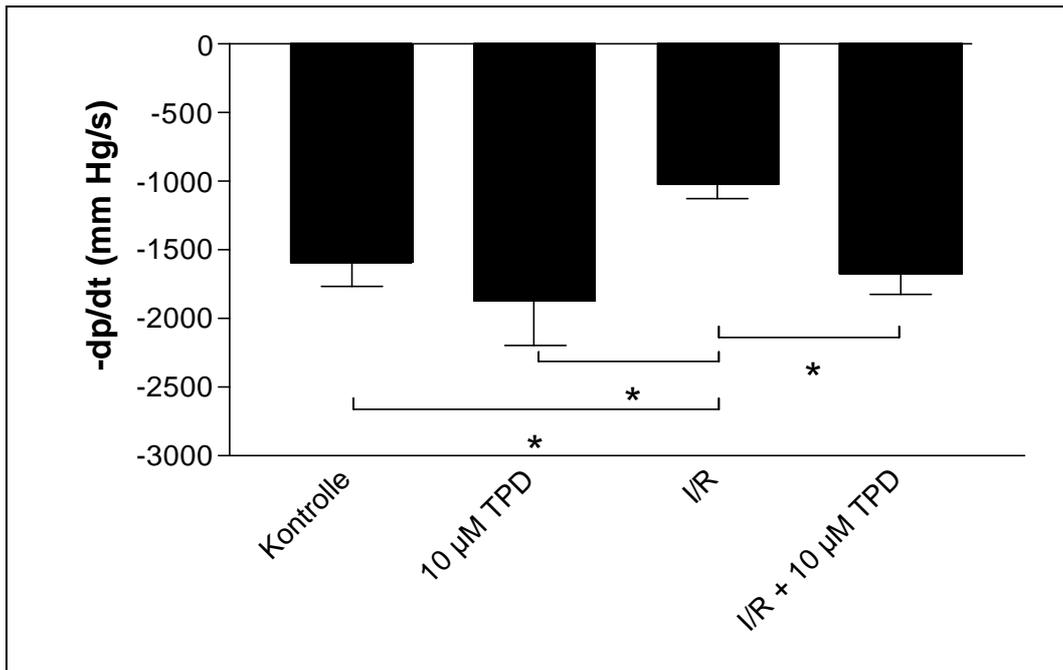


Abb. 3-2: Relaxationsgeschwindigkeit des Ventrikels am Ende des Versuchsprotokolls (t = 210 min) bei ischämischen und nicht-ischämischen Kaninchen-Herzen mit und ohne 10 µM Trapidil (TPD). Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 9 – 14 Herzen pro Gruppe. * p < 0.05.

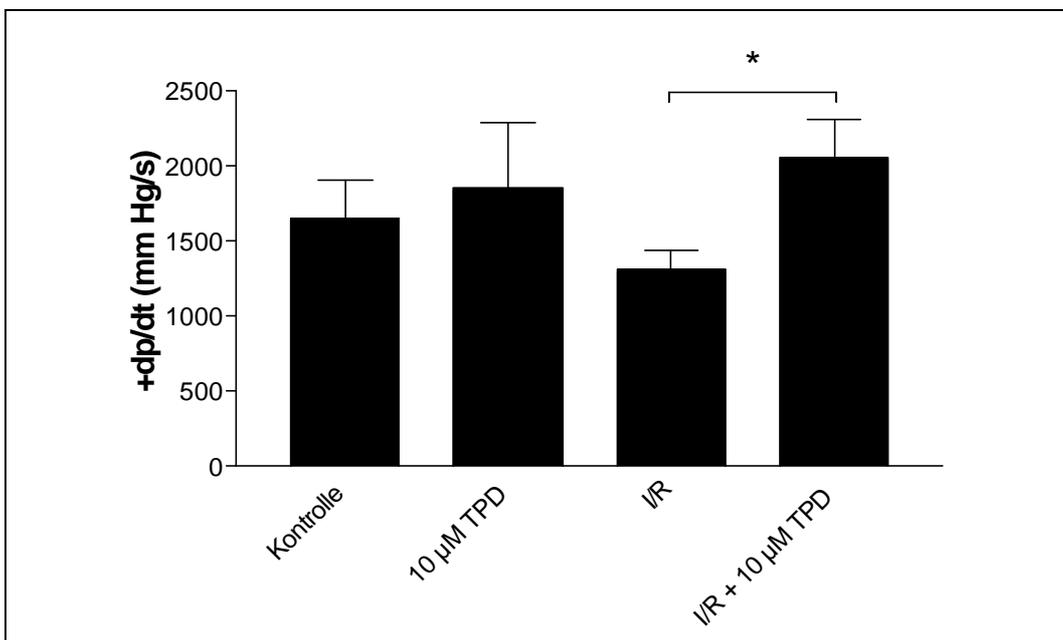


Abb. 3-3: Kontraktionsgeschwindigkeit des Ventrikels am Ende des Versuchsprotokolls (t = 210 min) bei ischämischen und nicht-ischämischen Kaninchen-Herzen mit und ohne 10 µM Trapidil (TPD). Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 9 – 14 Herzen pro Gruppe. * p < 0.05.

In den nicht-ischämischen Herzen konnten im Effluat am Ende des Versuchsprotokolls nur sehr geringe CK-Aktivitäten festgestellt werden. In den I/R-Herzen stieg die CK-Aktivität im

Effluat mit beginnender Reperfusion stark an und betrug am Ende der Reperfusion 302 ± 57 mU/g*min. Dieser Anstieg der Enzym-Aktivität wurde durch die Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Trapidil signifikant um 69% reduziert (Abb. 3-4).

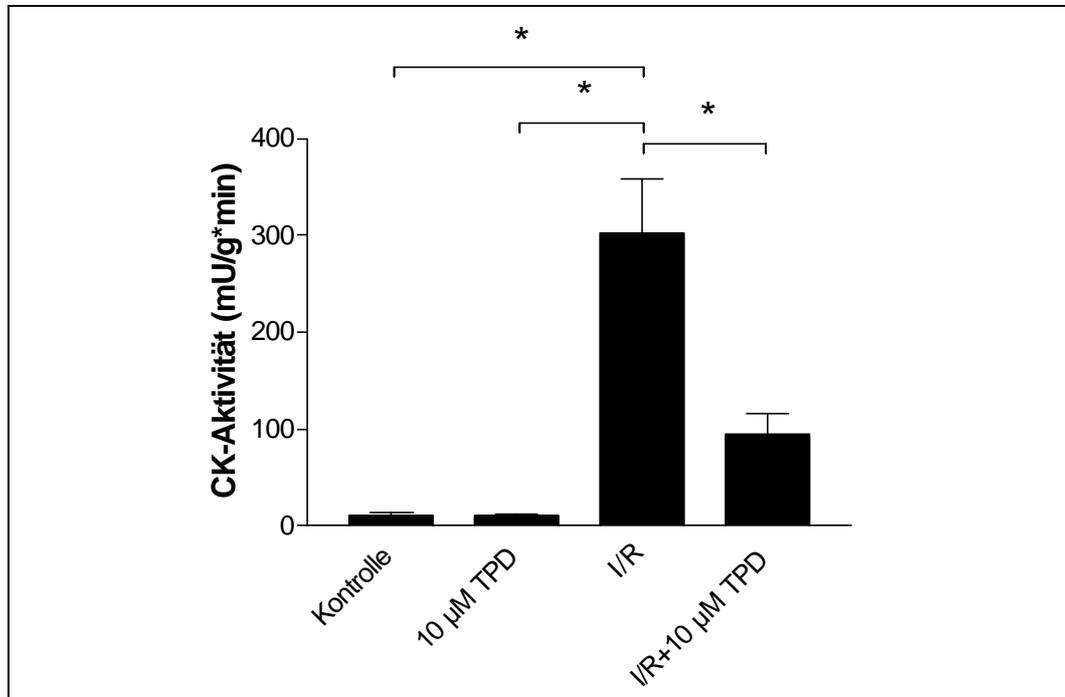


Abbildung 3-4: CK-Aktivität im Effluat am Ende des Versuchsprotokolls ($t = 210$ min) bei ischämischen und nicht-ischämischen Kaninchen-Herzen mit und ohne $10 \mu\text{M}$ Trapidil (TPD). Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 9 – 14 Herzen pro Gruppe. * $p < 0.05$.

Die aus den Herzen der einzelnen Gruppen gewonnenen Proteine wurden für Western-Blots verwendet. Abbildung 3-5 zeigt einen repräsentativen Western-Blot mit dem Antikörper PS16, welcher Änderungen der PKA-abhängigen Phosphorylierung von PLB in den einzelnen Gruppen zeigt. Mit dem Antikörper A1, mit welchem die PVDF-Membranen nach dem 'stripping' inkubiert wurden, konnte gezeigt werden, dass die Gesamtmenge von PLB unter allen Versuchsbedingungen unverändert erscheint. Im Gegensatz hierzu führte jedoch I/R zu einem nahezu völligen Verschwinden der unter Kontroll-Bedingungen zu beobachtenden PKA-abhängigen PLB-Phosphorylierung. Die Behandlung nicht-ischämischer Herzen mit Trapidil zeigte keinen deutlichen Effekt. Die Zugabe von Trapidil zu I/R-Herzen führte jedoch zu einer weitgehenden Aufhebung der Verminderung der Phosphorylierung von PLB und somit zu einer Annäherung an Kontroll-Werte. Die densitometrische Analyse validierte diese Beobachtung. Es zeigte sich, dass die PKA-abhängige Phosphorylierung von PLB an Ser¹⁶, dargestellt als Ratio Ser¹⁶-phosphoryliertes PLB/Gesamt-PLB, nach I/R von 198 ± 32 AU unter Kontrollbedingungen auf 21 ± 7 AU signifikant zurück ging. In der

Gruppe I/R + 10 μ M Trapidil zeigte sich jedoch eine signifikante Erhöhung der Phosphorylierungsrate, hier betrug der Wert am Ende der Reperfusion 129 ± 35 AU (Abb. 3-6).

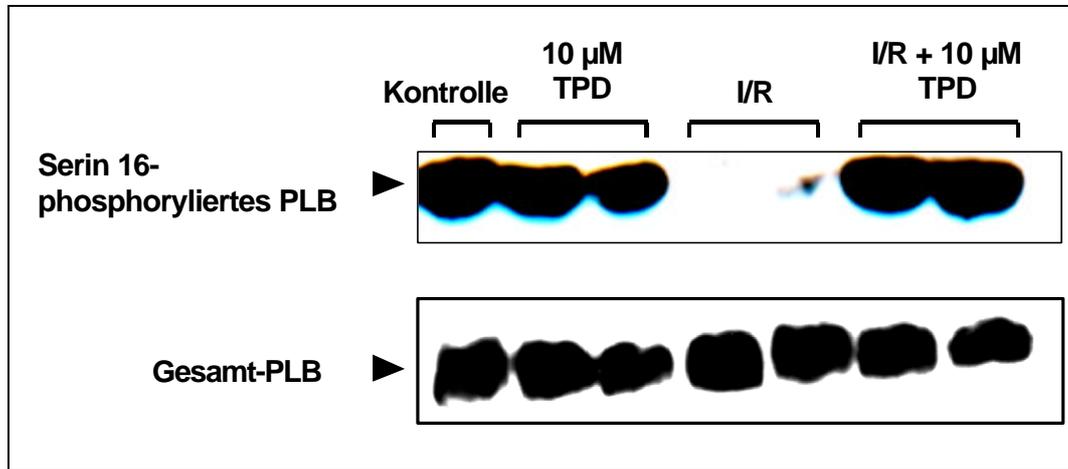


Abbildung 3-5: PKA-abhängige Phosphorylierung von PLB am Ende des Versuchsprotokolls ($t = 210$ min). Repräsentativer Western-Blot mit ischämischen und nicht-ischämischen Kaninchen-Herzen mit und ohne 10 μ M Trapidil (TPD). Ser¹⁶-phosphoryliertes PLB und Gesamt-PLB stammen aus einem einzigen Blot (Detektion von Gesamt-PLB nach 'stripping'). Jede Versuchsbedingung ist durch zwei Protein-Proben aus unterschiedlichen Herzen repräsentiert, nur eine Protein-Probe ist für Kontroll-Bedingungen gezeigt.

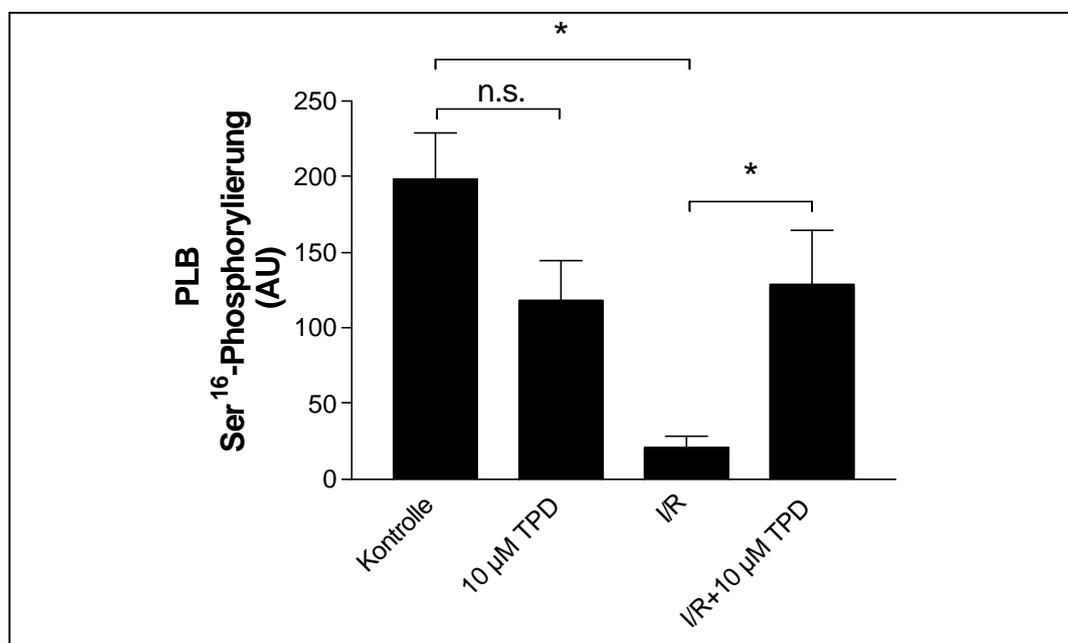


Abbildung 3-6: PKA-abhängige Phosphorylierung von PLB (dargestellt als Ratio Ser¹⁶-phosphoryliertes PLB/Gesamt-PLB) bei ischämischen und nicht-ischämischen Kaninchen-Herzen mit und ohne 10 μ M Trapidil (TPD) am Ende des Versuchsprotokolls ($t = 210$ min). Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 9 – 14 Herzen pro Gruppe. * $p < 0.05$. n.s. $p > 0.05$.

Weiterhin wurde der Einfluss von Trapidil auf die Ausschüttung von Prostacyclin untersucht. Dies erfolgte durch eine Konzentrationsbestimmung des stabilen Abbauproduktes 6-oxo-PGF_{1α} im Effluat der Langendorff-Herzen mittels RIA. Es kam zu einer starken Freisetzung von 6-oxo-PGF_{1α} während der ersten Minuten der Reperfusion. Über die Dauer der Reperfusion näherten sich die Werte wieder den Werten der Kontroll-Gruppe an. Trapidil hatte keinen Einfluss auf die 6-oxo-PGF_{1α}-Ausschüttung nicht-ischämischer Herzen. Auch bei I/R-Herzen bewirkte Trapidil keine signifikante Veränderung der 6-oxo-PGF_{1α}-Ausschüttung (Abb. 3-7).

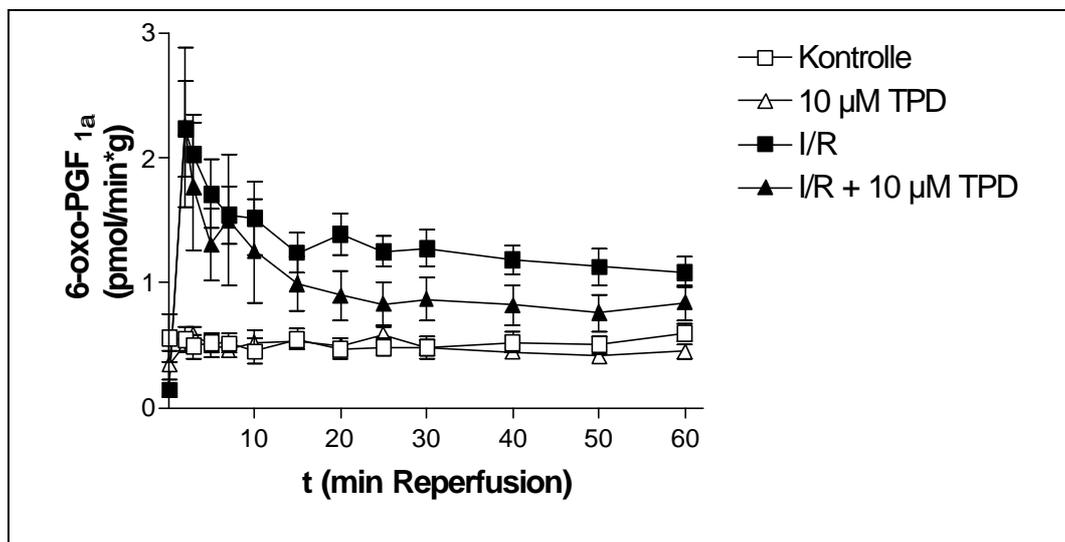


Abbildung 3-7: Verlauf der Freisetzung von PGI₂ während der Reperfusion anhand der 6-oxo-PGF_{1α}-Ausschüttung in das Effluat der Kaninchen-Herzen bei ischämischen (geschlossene Symbole) und nicht-ischämischen (offene Symbole) Herzen mit (Dreiecke) und ohne (Quadrate) 10 µM Trapidil (TPD). Daten sind Mittelwerte ± SEM von 9 – 14 Herzen pro Gruppe.

3.1.2 Behandlung von Ischämie/Reperfusion-Herzen mit Trapidil ausschließlich während der Reperfusion

Um zu bewerten, ob es sich bei der beobachteten Trapidil-Wirkung um einen Effekt handelt, der auf der Anwesenheit von Trapidil ausschließlich in der Reperfusion-Phase beruht, oder ob eine Behandlung mit Trapidil auch während der ischämischen Phase eine Voraussetzung für die kardioprotektive Wirkung ist, wurden Versuche durchgeführt, in denen Trapidil erst mit Beginn der Reperfusion (t = 150 min) infundiert wurde. Die erhaltenen Werte wurden mit denen der unbehandelten I/R-Herzen verglichen. Um vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurden nur Herzen mit einer ischämischen Kontraktur > 10 mm Hg aus den Gruppen I/R und I/R + 10 µM Trapidil bei Reperfusion in die Auswertung einbezogen. Der Verlauf des

LVEDP während der ischämischen Phase war in beiden Gruppen nahezu identisch. Während der Reperfusion konnte 10 μM Trapidil keine Verringerung des LVEDP bewirken, obwohl dies in Herzen, die Trapidil auch während der ischämischen Phase erhielten, der Fall war (Abb. 3-8).

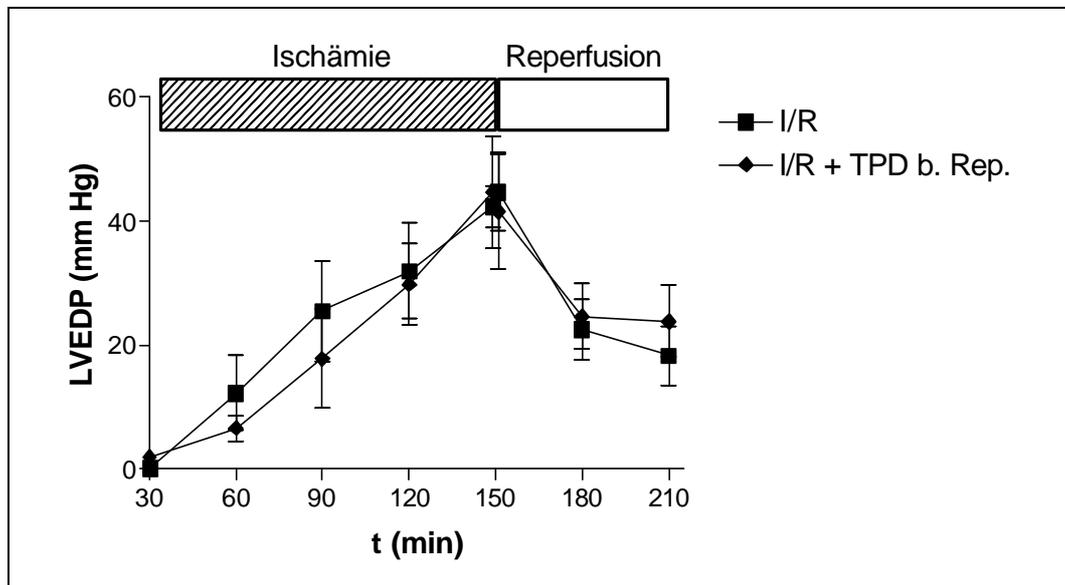


Abbildung 3-8: Zeitlicher Verlauf des LVEDP bei ischämischen Kaninchen-Herzen mit einem LVEDP > 10 mm Hg ohne (Quadrate) oder ausschließlich bei Reperfusion mit (Rhomben) 10 μM Trapidil (TPD b. Rep.). Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 6 - 9 Herzen pro Gruppe.

Am Ende der Reperfusion zeigte keiner der Parameter HF, CPP, ΔLVP , $-\text{dp}/\text{dt}$ und $+\text{dp}/\text{dt}$ aus der Gruppe der Herzen, die Trapidil ausschließlich bei Reperfusion erhielten, eine Änderung gegenüber den Werten aus unbehandelten I/R-Herzen.

Bei Betrachtung der CK-Aktivität, gemessen im Effluat der Langendorff-Herzen, fällt auf, dass die Werte der Gruppe, in der Trapidil nur bei Reperfusion gegeben wurde, nicht signifikant unterschiedlich von denen der unbehandelten I/R-Herzen waren. Obwohl eine leichte Abnahme der Werte zu beobachten war, blieb die signifikante Verringerung, welche in der Gruppe I/R + 10 μM Trapidil aufgetreten war, aus (Abb. 3-9). Diese ausbleibende Änderung der Werte für die CK-Aktivität ist in Übereinstimmung mit den sich nicht ändernden LVEDP-Werten im Verlaufe der Reperfusion sowie der Übereinstimmung der Parameter HF, CPP, ΔLVP , $-\text{dp}/\text{dt}$ und $+\text{dp}/\text{dt}$ mit den unbehandelten I/R-Herzen.

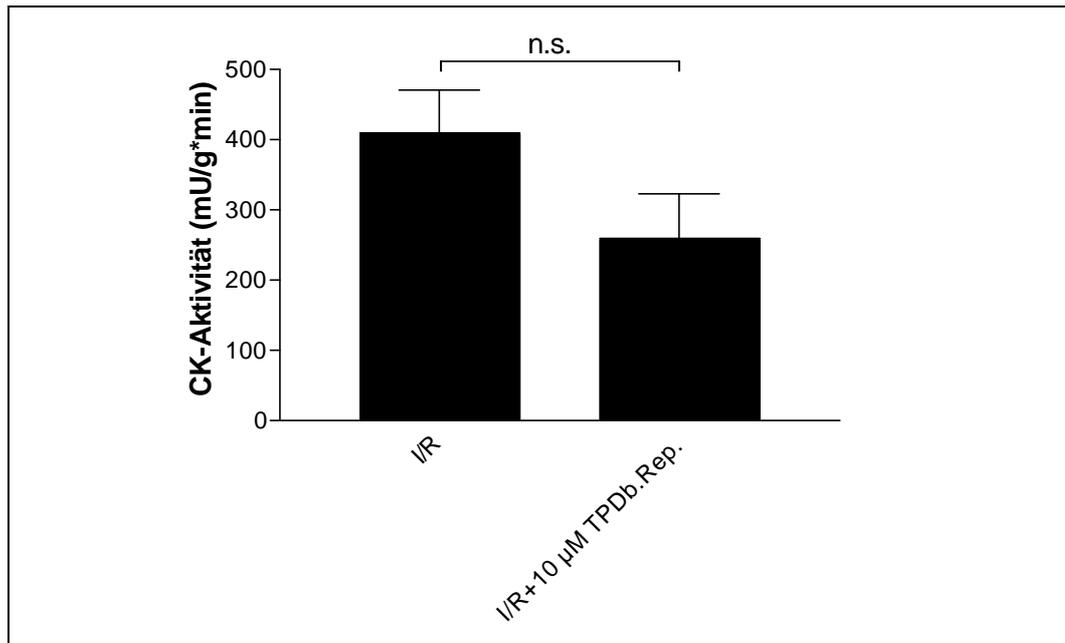


Abbildung 3-9: CK-Aktivität im Effluat der Kaninchen-Herzen am Ende der Reperfusion ($t = 210$ min) bei ischämischen Herzen mit einem LVEDP > 10 mm Hg ohne und ausschließlich bei Reperfusion mit $10 \mu\text{M}$ Trapidil (TPD b. Rep.). Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 6 - 9 Herzen pro Gruppe. n.s. $p > 0.05$.

3.1.3 Behandlung von Ischämie/Reperfusion-Herzen mit Cycloheximid

In dieser Versuchsreihe wurde ein Vergleich angestellt zwischen Herzen, welche vor der ischämischen Phase 40 min mit $10 \mu\text{M}$ Cycloheximid behandelt wurden und Herzen, die zusätzlich zu diesem noch $10 \mu\text{M}$ Trapidil über die gesamte Versuchsdauer erhielten, einsetzend 30 min vor Ischämie-Beginn. Ziel der Applikation des Proteinsynthese-Hemmers Cycloheximid war es, zu beurteilen, ob die kardioprotektive Wirkung von Trapidil in Zusammenhang mit einer Proteinneusynthese steht.

Cycloheximid zeigte in dieser Versuchsreihe eine deutlich kardioprotektive Wirkung. Unter dem Einfluss der Substanz kam es zu einer Reduktion der diastolischen Kontraktur in den I/R-Herzen im Vergleich zu unbehandelten I/R-Herzen. Weiterhin war bei Cycloheximid-Applikation in Übereinstimmung mit der verminderten diastolischen Kontraktur ein deutlicher Trend einer verringerten CK-Freisetzung zu beobachten. Ansonsten zeigten sich im Vergleich der beiden Cycloheximid-behandelten Gruppen mit den unbehandelten I/R-Herzen keinerlei Unterschiede der Parameter HF, CPP, ΔLVP , $-\text{dp}/\text{dt}$ und $+\text{dp}/\text{dt}$.

Der Verlauf des LVEDP war in der Gruppe, die ausschließlich mit Cycloheximid behandelt wurde, und der Gruppe, die mit einer Kombination von Cycloheximid und Trapidil behandelt

wurde, identisch über die gesamte Dauer des Protokolls. Trapidil konnte also offensichtlich hier keine Änderung des LVEDP bewirken (Abb. 3-10). In Übereinstimmung mit diesem Befund zeigten auch die Parameter HF, CPP, Δ LVP, $-dp/dt$ und $+dp/dt$ keinerlei Unterschiede zwischen den beiden Gruppen I/R + Cycloheximid und I/R + Cycloheximid + Trapidil. Erwartungsgemäß zeigten auch die Werte für die CK-Freisetzung in den beiden Cycloheximid-behandelten Gruppen keinerlei Unterschiede auf (Abb. 3-11).

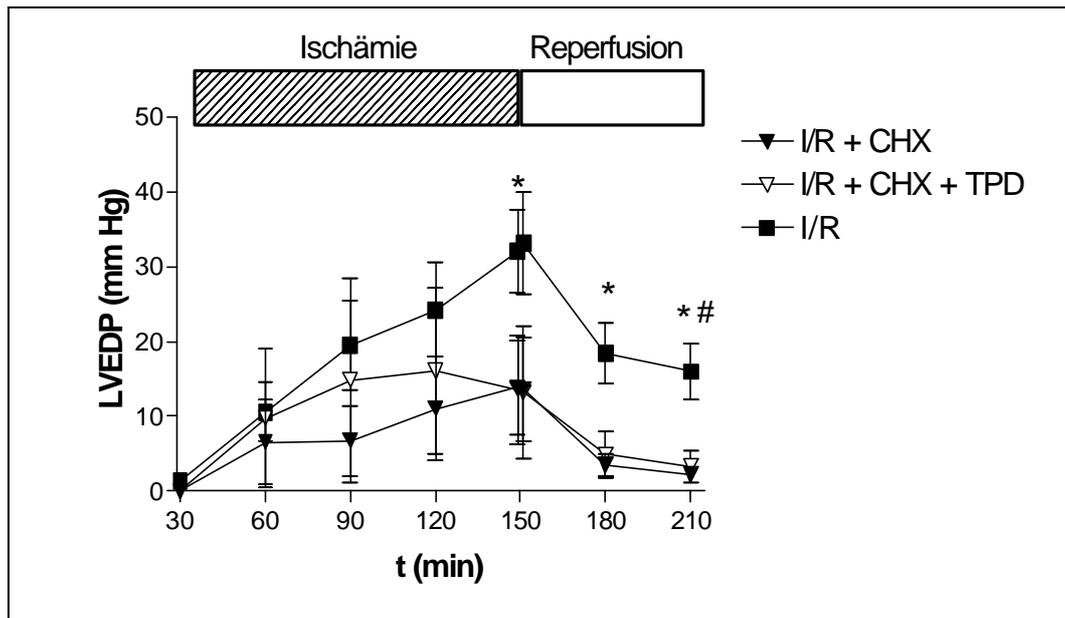


Abbildung 3-10: Zeitlicher Verlauf des LVEDP bei unbehandelten ischämischen (geschlossene Quadrate) und ischämischen, mit 10 μ M Cycloheximid (CHX) vorbehandelten Kaninchen-Herzen mit (offene Dreiecke) und ohne (geschlossene Dreiecke) 10 μ M Trapidil (TPD). Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 6 - 14 Herzen pro Gruppe. * $p < 0.05$ I/R + CHX vs. I/R. # $p < 0.05$ I/R + CHX + TPD vs. I/R.

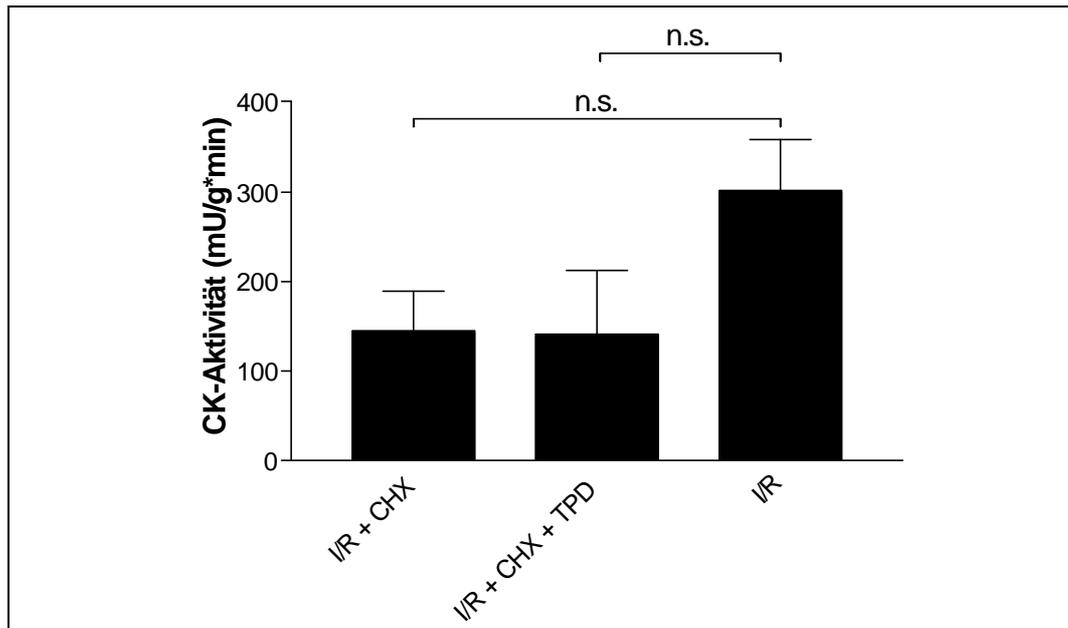


Abbildung 3-11: CK-Aktivität im Effluat am Ende des Versuchsprotokolls bei unbehandelten ischämischen und bei ischämischen, mit 10 μ M Cycloheximid (CHX) vorbehandelten Kaninchen-Herzen mit und ohne 10 μ M Trapidil (TPD). Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 6 - 14 Herzen pro Gruppe. n.s. $p > 0.05$.

3.2 Versuche nach Langendorff mit Mäusen

3.2.1 Etablierung des Modells

Im Gegensatz zu dem bereits etablierten Langendorff-Modell für Kaninchen wurde das I/R Modell nach Langendorff für Mäuse im Rahmen der vorliegenden Arbeit in der Arbeitsgruppe neu etabliert. Nach der Fertigstellung der Apparatur sowie Schaffung aller technischen Voraussetzungen für die Versuche musste für ein I/R-Modell eine geeignete Ischämiezeit für die Herzen gefunden werden. Diese sollte dabei so festgelegt werden, dass am Ende der Reperfusion eine Erholung des Δ LVP von etwa 50% gegeben ist. Es wurden dabei Zeiten von 30, 35, 40, 50 und 60 min für eine globale 'zero-flow'-Ischämie gewählt. Die Reperusionszeit wurde mit 45 min festgelegt.

Alle Gruppen mit unterschiedlichen Ischämie-Zeiten zeigten zum Zeitpunkt $t = 0$ min, also nach Äquilibration und vor Ischämie, annähernd gleiche Δ LVP-Werte. Weiterhin wiesen die Gruppen keine Unterschiede in den Parametern Koronarfluss oder LVEDP auf. Somit zeigten alle Gruppen gleiche Ausgangsbedingungen. Die Kontroll-Herzen wurden grundsätzlich nach Äquilibration 105 min bei konstantem Druck perfundiert.

Der zeitliche Verlauf des Δ LVP ist in Abbildung 3-12 dargestellt. Am Ende der Reperfusion führten Ischämie-Zeiten von 30, 35 und 40 min zu keiner statistisch relevanten Abweichung von der Kontrolle. Hingegen haben Ischämie-Zeiten von 50 min und 60 min eine signifikante Reduktion des Δ LVP um 40% bzw. 31% im Vergleich zur Kontrolle bewirkt. Diese Werte entsprechen einer 55%igen (bei 50 min Ischämie) bzw. 48%igen (bei 60 min Ischämie) Abnahme des Δ LVP-Wertes der Kontrolle bei $t = 0$ min. Eine etwa 50%ige Abnahme des Δ LVP war somit gegeben. Auffällig war, dass die Steigerung der Ischämie-Zeit von 50 min auf 60 min zu keiner Steigerung der Effekte führte.

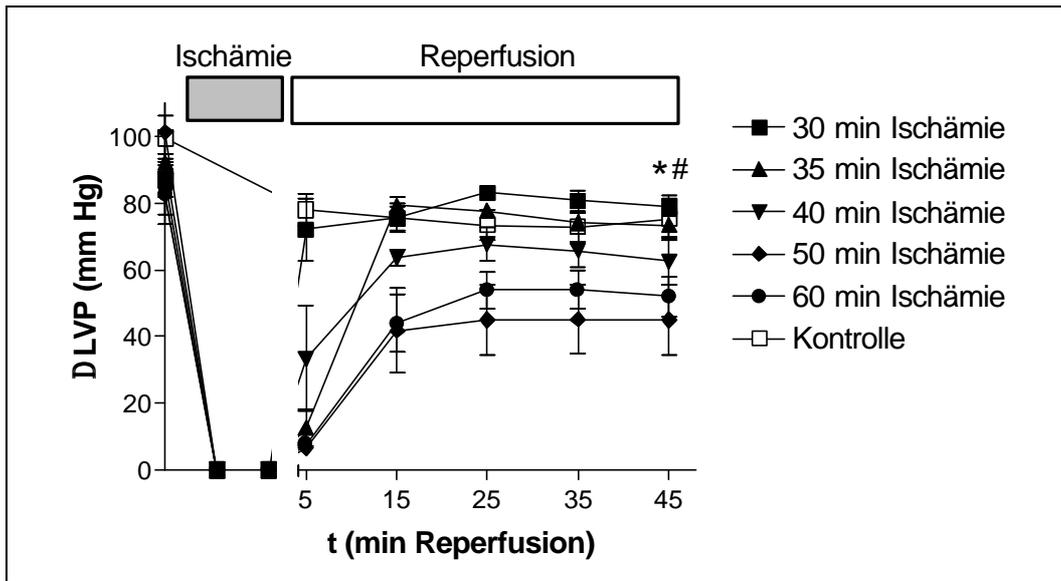


Abbildung 3-12: Zeitlicher Verlauf des Δ LVP bei nicht-ischämischen Mäuse-Herzen und Mäuse-Herzen mit unterschiedlichen Ischämie-Zeiten. Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 4 - 5 Herzen pro Gruppe. * $p < 0.05$ 50 min Ischämie vs. Kontrolle. # $p < 0.05$ 60 min Ischämie vs. Kontrolle.

Der LVEDP zeigte einen Verlauf, der dem des Kaninchen-Modells ähnlich war. Im Verlaufe der Ischämie kam es zu einer diastolischen Kontraktur des Ventrikels, deren Höhe jedoch von der Dauer der ischämischen Phase unbeeinflusst schien. Die Länge der ischämischen Phase beeinflusste jedoch die Höhe der Kontraktur mit einsetzender Reperfusion. Mit zunehmender Ischämie-Zeit nahm auch grob betrachtet die Wandspannung des Ventrikels am Beginn und auch im Verlauf der Reperfusion zu. Auch bei diesem Parameter konnte kein signifikanter Unterschied zwischen einer 50minütigen und einer 60minütigen Ischämie festgestellt werden (Abb. 3-13).

Auch die CK-Freisetzung zeigte eine Abhängigkeit von der Ischämie-Zeit. Die hier gemessenen Werte pro g Herz-Gewebe am Ende der Reperfusion lagen bei Mäusen verglichen mit dem Kaninchen-Modell weit höher. Mit Ausnahme des 40 min-Wertes zeigte sich hier ein stetiger Anstieg der CK-Aktivität mit zunehmender Länge der ischämischen Phase. Auch bei den Mäuse-Herzen zeigte sich bei Kontroll-Herzen vergleichbar mit den Kaninchen-Herzen eine nur sehr geringe CK-Aktivität im Effluat (Abb. 3-14).

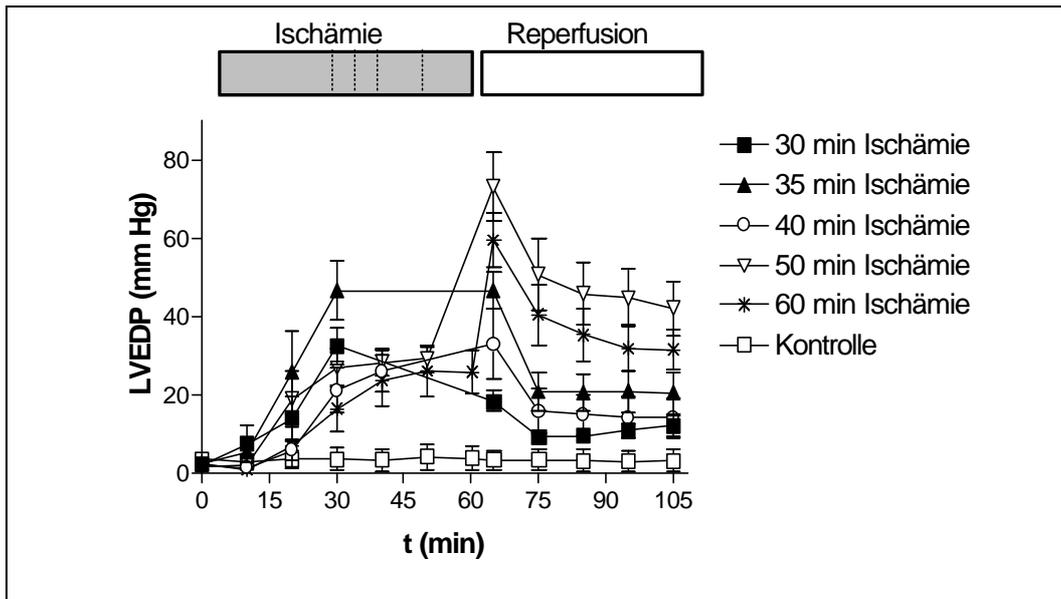


Abbildung 3-13: Zeitlicher Verlauf des LVEDP bei nicht-ischämischen Mäuse-Herzen und Mäuse-Herzen mit unterschiedlichen Ischämie-Zeiten. Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 4 - 5 Herzen pro Gruppe.

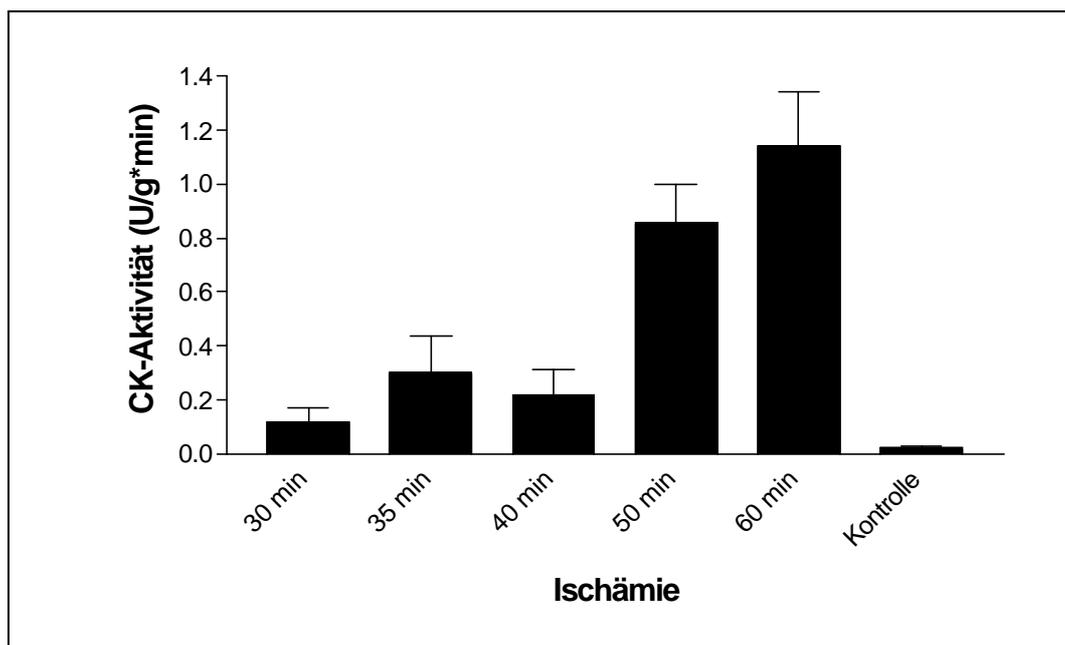


Abbildung 3-14: Abhängigkeit der CK-Aktivität im Effluat der Mäuse-Herzen von der Ischämie-Zeit. Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 4 - 5 Herzen pro Gruppe.

Zur weiteren Bestimmung der ischämischen Schädigung des Myokards wurden die Herzen am Ende der Reperfusion mit TTC gefärbt. Einige repräsentative Herz-Querschnitte aus Kontroll-Herzen sowie aus Herzen mit 30, 40 und 60 min Ischämie sind in Abbildung 3-15 gezeigt. Hier war bereits deutlich die Zunahme der ungefärbten, also nekrotischen, Bereiche mit zunehmender Ischämie-Zeit zu erkennen. Dieser Eindruck bestätigte sich nach Vermessung der nekrotischen und vitalen Bereiche aller Herzen. Es fiel jedoch auf, dass der

Anteil nekrotischen Gewebes in Herzen, die 50 und 60 min Ischämie ausgesetzt waren, mit 60% nicht nur sehr groß, sondern auch praktisch gleich groß war. Ebenso fiel ein kleiner Anteil nekrotischen Gewebes von 6% in Kontrollherzen auf (Abb. 3-16).

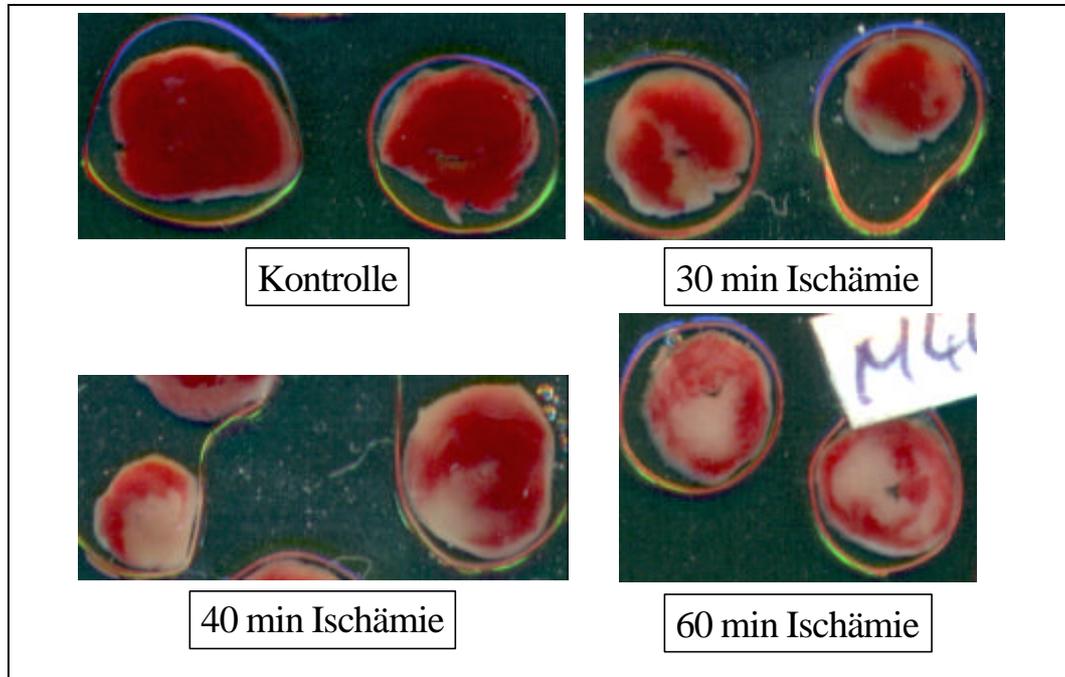


Abbildung 3-15: Repräsentative, mit TTC gefärbte Mäuse-Herz-Querschnitte aus nicht-ischämischen Herzen sowie aus Herzen mit 30, 40 und 60 min Ischämie. Die roten Bereiche zeigen vitales Gewebe, die ungefärbten Bereiche zeigen nekrotisches Gewebe.

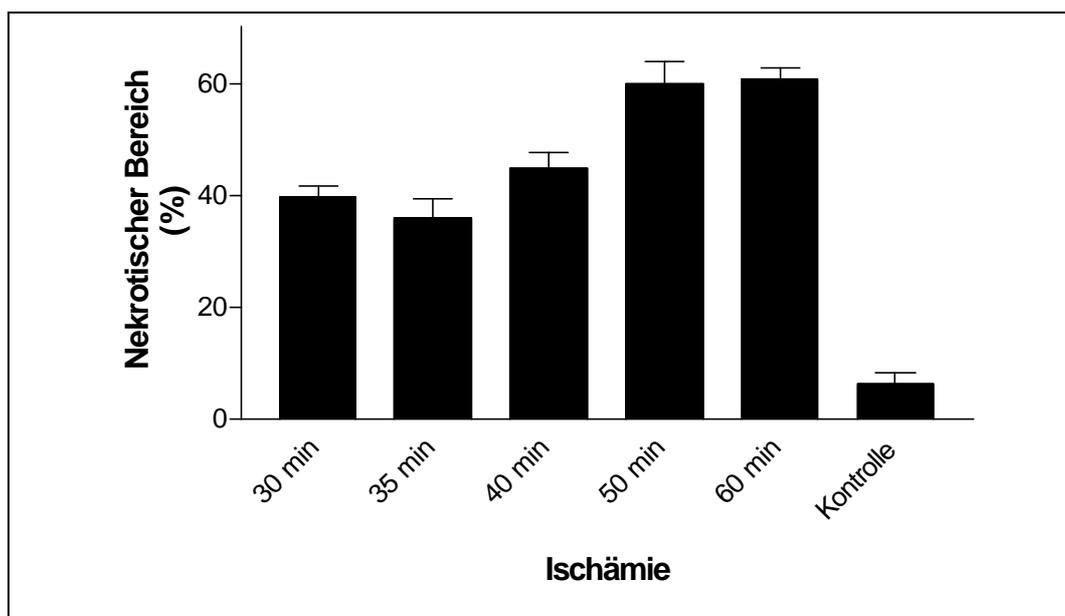


Abbildung 3-16: Anteil des nekrotischen Gewebes bei nicht-ischämischen Mäuse-Herzen sowie Mäuse-Herzen mit unterschiedlichen Ischämie-Zeiten am Ende der Reperfusion. Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 4 - 5 Herzen pro Gruppe.

3.2.2 Einfluss von Trapidil bei Ischämie/Reperfusion bei Mäusen

Alle weiteren Versuche wurden nach der Etablierung des Modells mit einer Ischämie-Zeit von 60 min und einer Reperfusion-Zeit von 45 min durchgeführt. In dieser Versuchsreihe sollte überprüft werden, ob Trapidil auch bei Mäusen im I/R-Langendorff-Modell kardioprotektiv wirkt, und wenn ja, welche Konzentration an Trapidil für eine Wirkung notwendig ist. Es wurden daher Trapidil-Konzentrationen von 10 μM und 100 μM sowohl bei ischämischen als auch bei nicht-ischämischen Herzen eingesetzt.

Die Applikation erfolgte bei den Mäuse-Herzen bereits mit Beginn der Perfusion, da Trapidil in einer Konzentration von 10 μM bzw. 100 μM im Perfusat gelöst war. Daher gibt eine Messung der verschiedenen Parameter zum Zeitpunkt $t = 0$ min, also unmittelbar vor Beginn der globalen 'zero-flow'-Ischämie, Auskunft über den Einfluss von Trapidil auf die Herzen vor I/R. Zu diesem Zeitpunkt lassen sich die Herzen aufgrund der noch ausstehenden Ischämie in nur drei Gruppen einteilen, abhängig von der Trapidil-Konzentration. Der Parameter LVEDP blieb zum Zeitpunkt $t = 0$ min von 10 μM und 100 μM Trapidil unbeeinflusst (Abb. 3-17). Jedoch zeigten die Parameter Koronarfluss, ΔLVP , $-\text{dp}/\text{dt}$ und $+\text{dp}/\text{dt}$ einen deutlichen Einfluss von Trapidil in einer Konzentration von 100 μM . Bei Betrachtung des Koronarflusses war eine signifikante Erhöhung um 55% in der Gruppe mit 100 μM Trapidil gegenüber der Gruppe ohne Trapidil zu verzeichnen. Die Gruppe, welche mit 10 μM Trapidil behandelt wurde, zeigte keinen signifikanten Unterschied im Koronarfluss im Vergleich zur Kontrolle. Ein ähnliches Bild ergab sich für den ΔLVP . Unter dem Einfluss von 100 μM Trapidil kam es zu einer signifikanten Steigerung des aktiv entwickelten linksventrikulären Druckes um 28% im Vergleich zu Kontroll-Herzen. Keine signifikante Steigerung war für eine Trapidil-Konzentration von 10 μM zu beobachten. Ebenso wurden Relaxationsgeschwindigkeit und Kontraktionsgeschwindigkeit der auf 500 Schläge/min eingestellten Herzen durch Trapidil beeinflusst. Bei der Relaxation war eine leichte, jedoch nicht signifikante Steigerung der Geschwindigkeit unter dem Einfluss von 10 μM Trapidil zu beobachten. Hingegen führten 100 μM Trapidil zu einer signifikanten Steigerung um 27%. Bei der Kontraktionsgeschwindigkeit zeigte sich ein ähnlicher Effekt von Trapidil. Bei einer Konzentration von 10 μM führte die Substanz zu einer leichten, nicht signifikanten Erhöhung dieses Parameters. Die Behandlung mit 100 μM Trapidil führte zu einer weiteren Steigerung von $+\text{dp}/\text{dt}$, es kam zu einer signifikanten Zunahme um 30% (Tabelle 3-2).

Parameter	0 TPD	10 μ M TPD	100 μ M TPD
Δ LVP (mm Hg)	102 \pm 5	113 \pm 6	131 \pm 6 *
Koronarfluss (ml/min)	1.85 \pm 0.11	2.12 \pm 0.18	2.86 \pm 0.19 *
-dp/dt (mm Hg/s)	-3528 \pm 173	-4001 \pm 225	-4467 \pm 196 *
+dp/dt (mm Hg/s)	4150 \pm 230	4855 \pm 213	5379 \pm 271 *

Tabelle 3-2: Kardiale und koronare Funktionen der Mäuse-Herzen zum Zeitpunkt t = 0 min bei unterschiedlichen Trapidil (TPD)-Konzentrationen im Perfusat. Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 12 - 13 Herzen pro Gruppe. * p < 0.05 100 μ M TPD vs. 0 TPD.

Bei Betrachtung des LVEDP zeigte sich, dass weder 10 μ M noch 100 μ M Trapidil einen Einfluss auf nicht-ischämische Herzen hatten. Im Verlaufe der Ischämie war die typische diastolische Kontraktur des Ventrikels zu beobachten. Im Gegensatz zum Kaninchen-Modell war eine Konzentration von 10 μ M Trapidil jedoch nicht in der Lage, diese Kontraktur signifikant zu beeinflussen. Hingegen senkten 100 μ M Trapidil den LVEDP während der Ischämie signifikant zu den Zeitpunkten t = 30 min, t = 40 min, t = 50 min und t = 60 min. Mit Beginn der Reperfusion zeigte sich eine deutliche Zunahme der Kontraktur, welche im Laufe der Reperfusion langsam aber stetig abnahm. Sowohl 10 μ M als auch 100 μ M Trapidil waren in der Lage, diese Kontraktur während der Reperfusion deutlich zu vermindern. Dabei war die Verminderung der Kontraktur bei 100 μ M Trapidil zu allen Messzeitpunkten signifikant, bei 10 μ M Trapidil nur zu den Zeitpunkten t = 85 min, t = 95 min und t = 105 min signifikant, aber dennoch auch bei den übrigen Messzeitpunkten deutlich (Abb. 3-17).

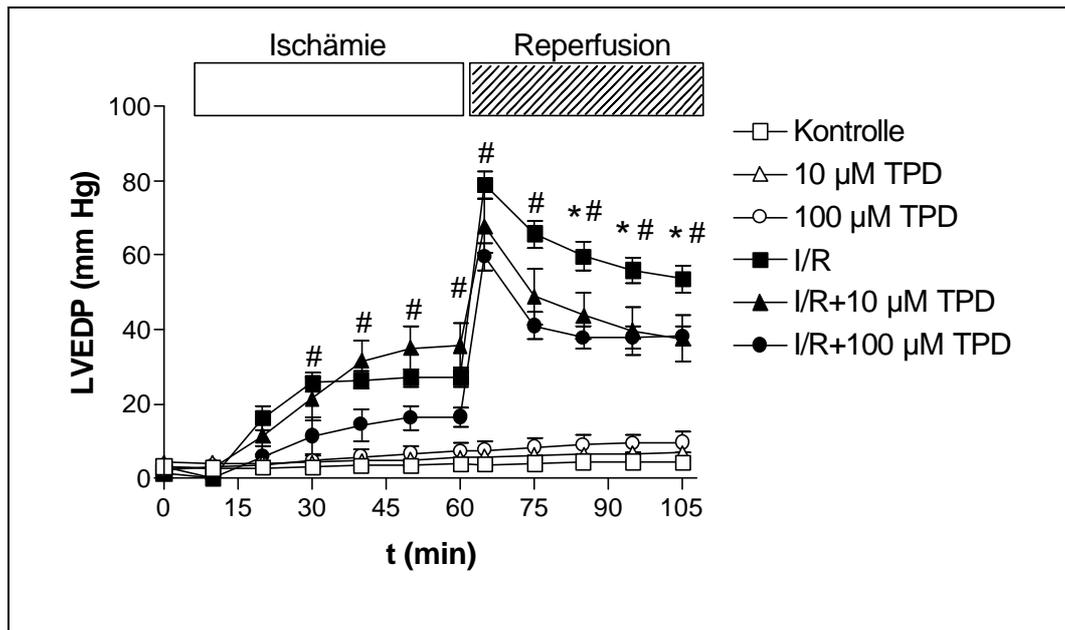


Abbildung 3-17: Zeitlicher Verlauf des LVEDP bei ischämischen (geschlossene Symbole) und nicht-ischämischen (offene Symbole) Mäuse-Herzen mit 10 µM (Dreiecke), 100 µM (Rhomben) und ohne (Quadrate) Trapidil (TPD). Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 5 - 8 Herzen pro Gruppe. * $p < 0.05$ I/R + 10 µM TPD vs. I/R. # $p < 0.05$ I/R + 100 µM TPD vs. I/R.

Der Δ LVP erschien unter nicht-ischämischen Bedingungen bei Applikation von 10 µM und 100 µM Trapidil am Ende des Versuchsprotokolls leicht, jedoch nicht signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle. In Abwesenheit von Trapidil zeigt sich bei I/R-Herzen eine signifikante Reduktion des Δ LVP um 61% im Vergleich zu Kontroll-Herzen. Die Applikation von 10 µM und 100 µM Trapidil konnte diese Ischämie-induzierte Reduktion nahezu vollständig aufheben. Obwohl immer noch etwas niedriger erscheinend, waren die Werte für Δ LVP bei mit 10 µM bzw. 100 µM Trapidil behandelten I/R-Herzen nicht mehr signifikant unterschiedlich von dem Wert für Kontroll-Herzen (Abb. 3-18).

Für den Koronarfluss ergab sich am Ende der Reperfusion ein ähnliches Bild wie zum Zeitpunkt $t = 0$ min. Ischämische und nicht-ischämische Herzen, welche mit 100 µM Trapidil behandelt wurden, zeigten auch am Ende der Reperfusion einen gegenüber Kontroll-Herzen und mit 10 µM Trapidil behandelten Herzen deutlich erhöhten Koronarfluss. Im Falle der ischämischen Herzen war diese Steigerung sogar signifikant. Festzuhalten bleibt, dass 10 µM Trapidil keine Veränderung des Koronarflusses herbeiführten im Vergleich zu unbehandelten Herzen (Abb. 3-19).

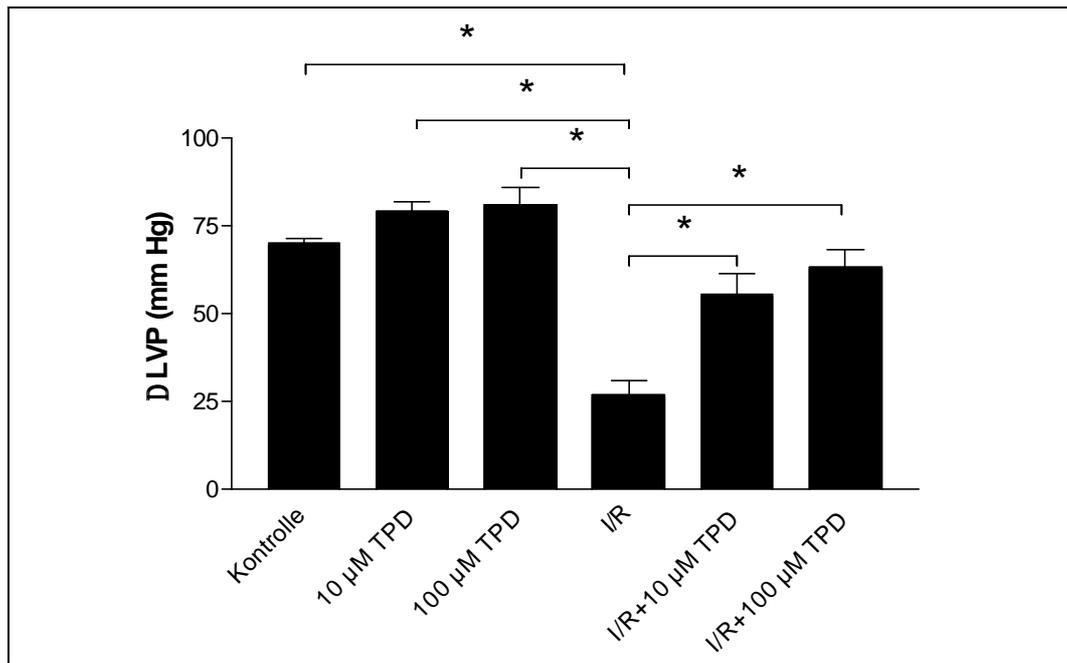


Abbildung 3-18: Δ LVP am Ende des Versuchsprotokolls ($t = 105$ min) bei ischämischen und nicht-ischämischen Mäuse-Herzen mit $10 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ und ohne Trapidil (TPD). Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 5 - 8 Herzen pro Gruppe. * $p < 0.05$.

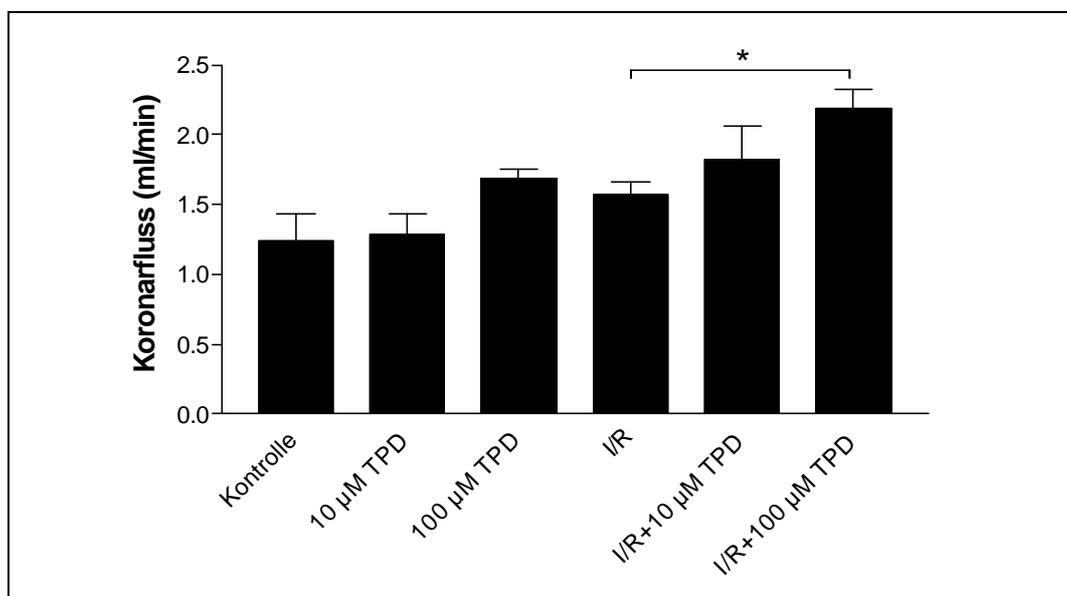


Abbildung 3-19: Koronarfluss am Ende des Versuchsprotokolls ($t = 105$ min) bei ischämischen und nicht-ischämischen Mäuse-Herzen mit $10 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ und ohne Trapidil (TPD). Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 5 - 8 Herzen pro Gruppe. * $p < 0.05$.

Bei Betrachtung der Relaxationsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt $t = 105$ min zeigte sich ein nahezu gleich starker Effekt von $10 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ Trapidil auf nicht-ischämische Herzen. Unter beiden Trapidil-Konzentrationen zeigte sich ein deutlicher Trend einer Erhöhung,

jedoch bei 100 μM Trapidil keine signifikante Erhöhung der Relaxationsgeschwindigkeit wie zum Zeitpunkt $t = 0$ min (siehe Tabelle 3-2). I/R bewirkte eine massive Reduktion von $-\text{dp}/\text{dt}$ um 63% im Vergleich zur Kontrolle. Diese Reduktion wurde durch die Trapidil-Applikation nahezu vollständig aufgehoben. Sowohl die Werte für $-\text{dp}/\text{dt}$ unter 10 μM als auch unter 100 μM Trapidil in ischämischen Herzen zeigten keinen signifikanten Unterschied mehr zu den Werten der Kontroll-Herzen auf (Abb. 3-20).

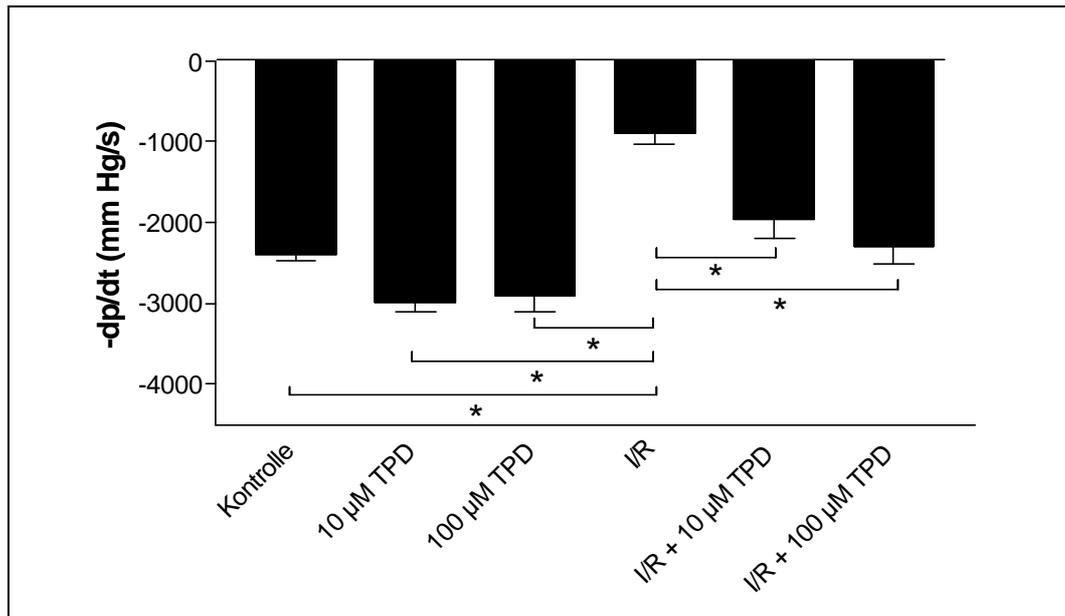


Abbildung 3-20: Relaxationsgeschwindigkeit des Ventrikels am Ende des Versuchsprotokolls ($t = 105$ min) bei ischämischen und nicht-ischämischen Mäuse-Herzen mit 10 μM , 100 μM und ohne Trapidil (TPD). Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 5 - 8 Herzen pro Gruppe. * $p < 0.05$.

Im Gegensatz zum Zeitpunkt $t = 0$ min fand sich für die Kontraktionsgeschwindigkeit kein signifikanter Einfluss von 10 μM oder 100 μM Trapidil auf nicht-ischämische Herzen zum Zeitpunkt $t = 105$ min. Auch bei diesem Parameter fand sich eine massive Reduktion unter dem Einfluss einer Ischämie, die Kontraktionsgeschwindigkeit ging signifikant um 64% zurück. In Übereinstimmung mit der Relaxationsgeschwindigkeit bewirkten 10 μM und 100 μM Trapidil eine nahezu vollständige Aufhebung dieser Ischämie-induzierten Veränderung des Wertes (Abb. 3-21).

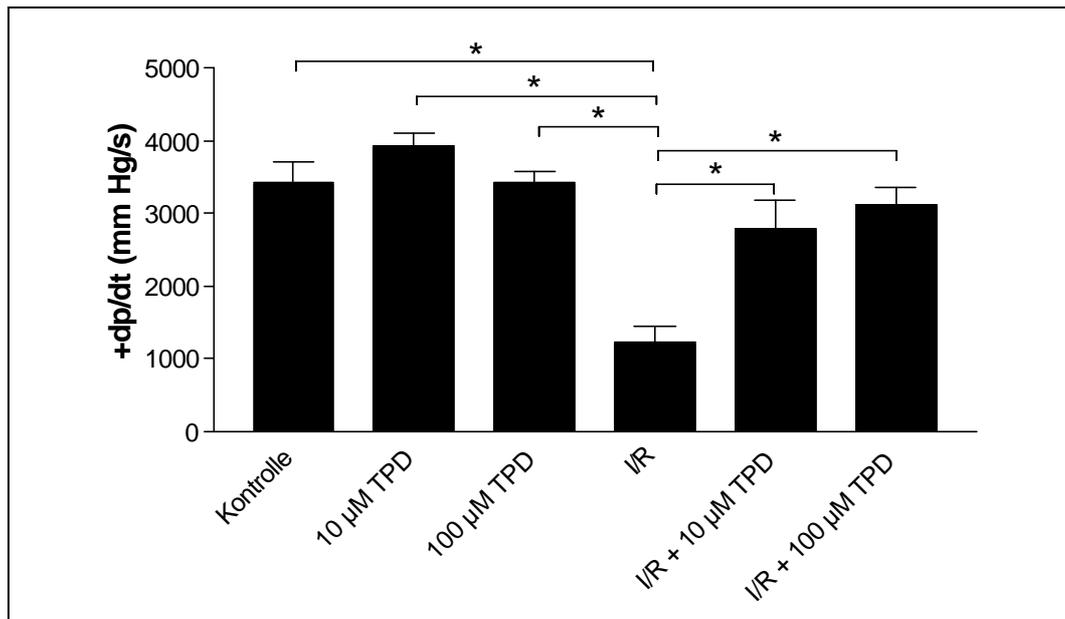


Abbildung 3-21: Kontraktionsgeschwindigkeit des Ventrikels am Ende des Versuchsprotokolls ($t = 105$ min) bei ischämischen und nicht-ischämischen Mäuse-Herzen mit $10 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ und ohne Trapidil (TPD). Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 5 - 8 Herzen pro Gruppe. * $p < 0.05$.

Die hier gezeigten positiven Veränderungen der Parameter, die Trapidil bei ischämischen Herzen bewirkt hat, spiegelten sich auch in der CK-Freisetzung der Herzen wider. Sowohl $10 \mu\text{M}$ als auch $100 \mu\text{M}$ Trapidil führten am Ende der Reperfusion zu einer signifikanten Reduktion der CK-Freisetzung um 56% bzw. um 66%. Trapidil zeigte dabei auf die Freisetzung von CK bei nicht-ischämischen Herzen über das gesamte Versuchsprotokoll keinerlei Einfluss (Abb. 3-22).

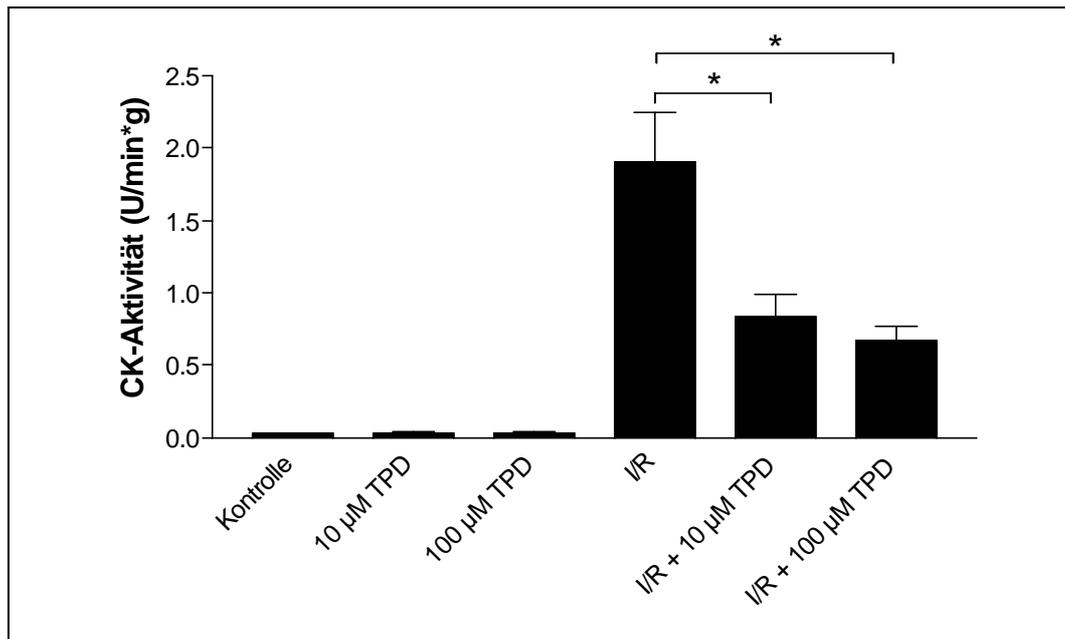


Abbildung 3-22: CK-Aktivität im Effluat der Mäuse-Herzen am Ende des Versuchsprotokolls bei ischämischen und nicht-ischämischen Herzen mit 10 µM, 100 µM und ohne Trapidil (TPD). Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 5 - 8 Herzen pro Gruppe. * $p < 0.05$.

Aus den Mäuse-Herzen wurden zur Western-Blot-Analyse Proteine gewonnen. Bei den Mäusen wurde eine Regulation der PKA-Expression unter den verschiedenen Versuchsbedingungen untersucht. Vor dieser Untersuchung wurde ermittelt, welche Isoformen der PKA – sowohl regulatorische als auch katalytische – im Mäuseherzen vorkommen. Hierzu wurden aus verschiedenen Geweben unterschiedlicher Spezies Proteine gewonnen und das Vorkommen der Isoformen verglichen. Verwendet wurden glatte Gefäßmuskelzellen aus bovinen Koronararterien, glatte Gefäßmuskelzellen aus der humanen Aorta, Arteria mammaria und Vena saphena, sowie Herz, Hirn und Lunge der Maus. Die Gewebe stammten im Falle der bovinen und humanen Zellen aus einer Zellkultur, die aus Explantaten angelegt wurde, im Falle der Maus-Gewebe wurden die Organe aus einer gesunden Maus entsprechend Material und Methoden 2.1.2.1 wie für das Mäuse-Herz aufgeführt entnommen. Im Western-Blot wurden jeweils 10 µg Protein aufgetragen, die Aufarbeitung der Gewebe erfolgte entsprechend Material und Methoden 2.5.1 wie die Aufarbeitung des Mäuse-Herzens.

Es zeigte sich, dass die verwendeten humanen Gewebe und das Hirn der Maus alle vier regulatorischen Isoformen exprimieren. In den glatten Gefäßmuskelzellen boviner Koronararterien fanden sich mit Ausnahme der RII α alle Isoformen, in der Lunge der Maus

nur die RII-Untereinheiten. Im Herzen der Maus konnte hier jedoch nur eine Isoform nachgewiesen werden, nämlich die RII α (Abb. 3-23).

Bei den katalytischen Untereinheiten fanden sich in allen verwendeten Geweben mit Ausnahme der Mäuse-Lunge alle drei Isoformen. Bei der Mäuse-Lunge lies sich die C β nicht nachweisen. Auffällig waren die offensichtlich beträchtlichen Konzentrationsunterschiede der katalytischen PKA-Untereinheiten zwischen den einzelnen Geweben. Im Mäuse-Herz fanden sich alle drei Isoformen, die Banden blieben jedoch eher schwach (Abb. 3-24).

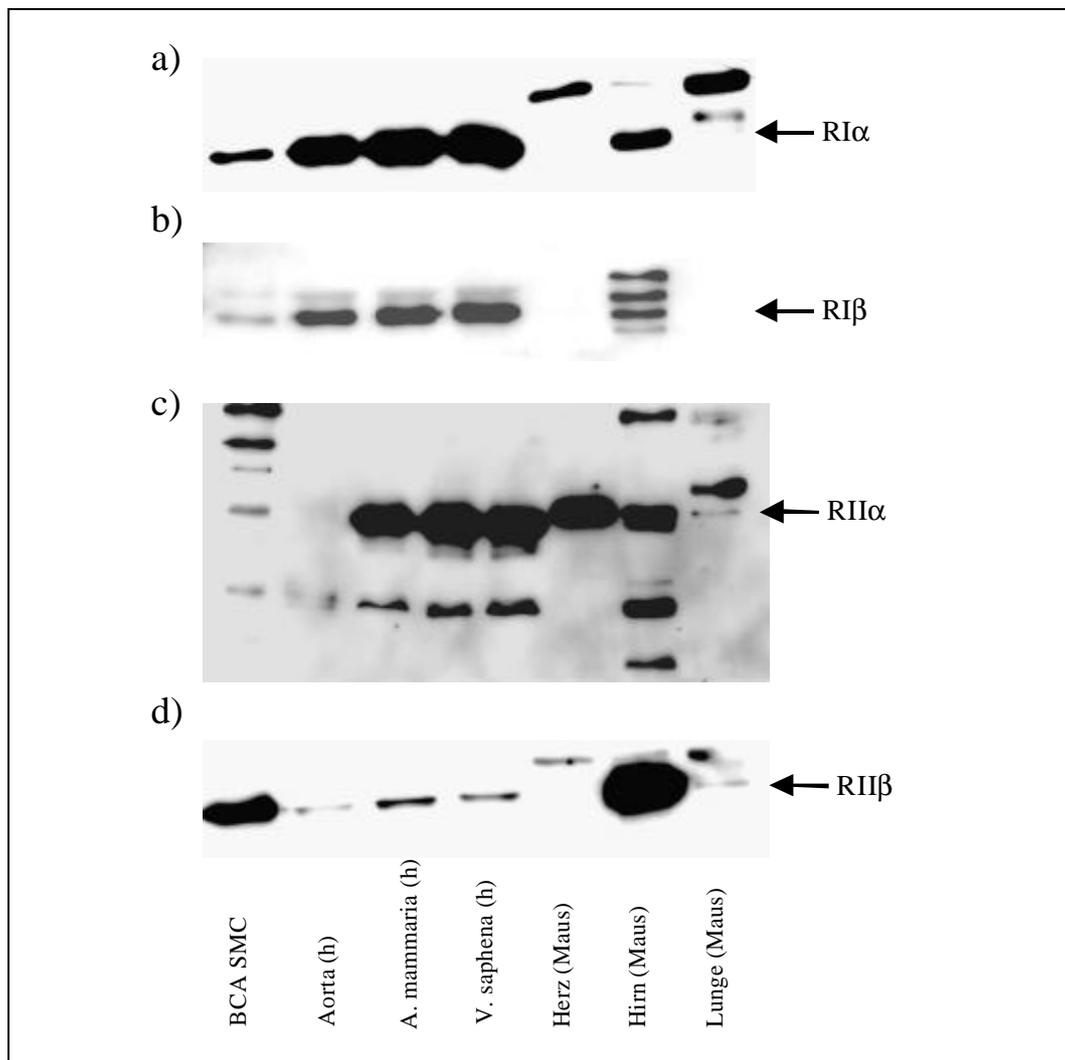


Abbildung 3-23: Vorkommen der vier regulatorischen PKA-Untereinheiten (a): RI α , b): RI β , c): RII α und d): RII β) in verschiedenen Geweben unterschiedlicher Spezies. Untersucht wurden glatte Gefäßmuskelzellen aus bovinen Koronararterien (BCA SMC), glatte Gefäßmuskelzellen aus der humanen Aorta (Aorta (h)), Arteria mammaria (A. mammaria (h)) und Vena saphena (V. saphena (h)), sowie Herz, Hirn und Lunge der Maus. Die Pfeile markieren die jeweilige Bande.

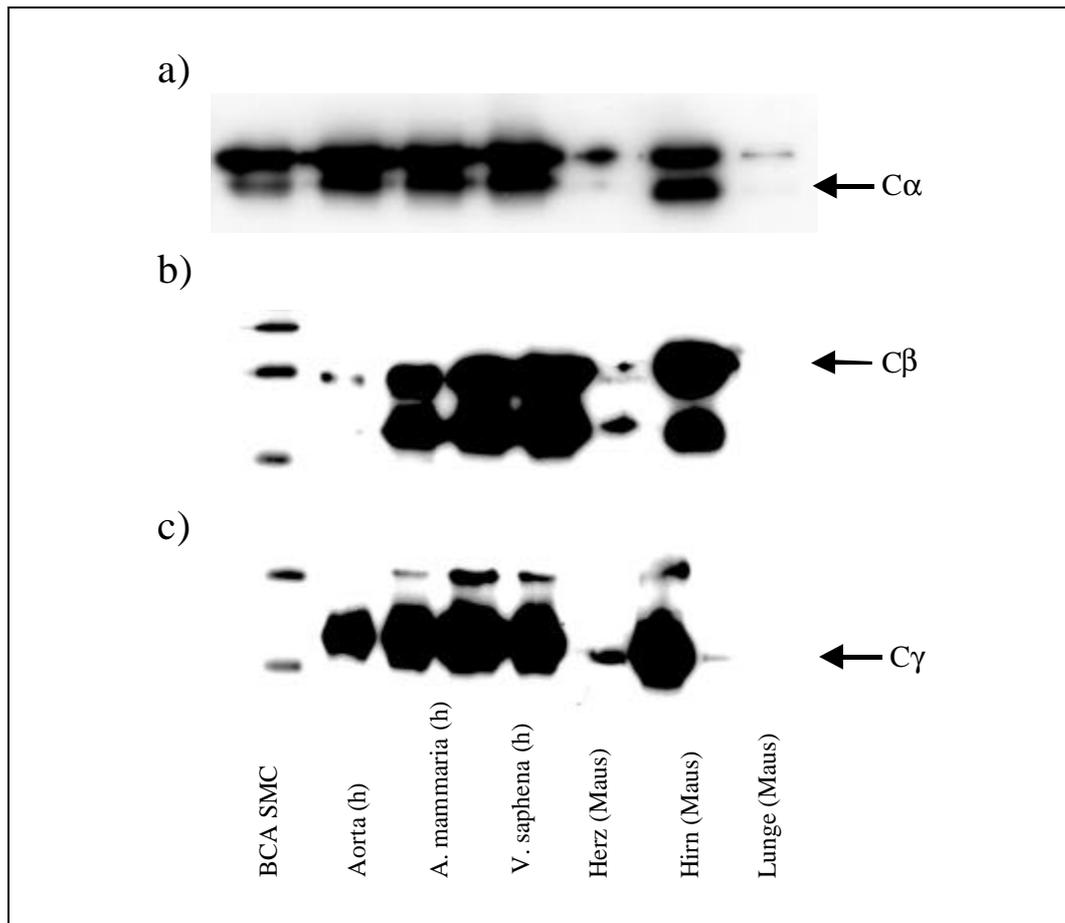


Abbildung 3-24: Vorkommen der drei katalytischen PKA-Untereinheiten (a): C α , b): C β und c): C γ) in verschiedenen Geweben unterschiedlicher Spezies. Untersucht wurden glatte Gefäßmuskelzellen aus bovinen Koronararterien (BCA SMC), glatte Gefäßmuskelzellen aus der humanen Aorta (Aorta (h)), Arteria mammaria (A. mammaria (h)) und Vena saphena (V. saphena (h)), sowie Herz, Hirn und Lunge der Maus. Die Pfeile markieren die jeweilige Bande.

Als nächster Schritt wurde die Expression der regulatorischen Untereinheiten der PKA in Mäuse-Herzen unter den verschiedenen Versuchsbedingungen untersucht. Da die Voruntersuchung gezeigt hatte, dass ausschließlich die RII α im Rahmen dieser Arbeit in Mäuse-Herzen nachgewiesen werden konnte und da sich auch unter I/R und/oder Trapidil-Applikation keine Induktion der RII β -Expression zeigte, wurden die Western-Blots auf die RII α beschränkt. Wie die densitometrische Auswertung der Blots ergab, führte I/R zu einem Anstieg der Expression von RII α . Es konnte jedoch kein signifikanter Einfluss von Trapidil auf die RII α -Expression gezeigt werden, weder in nicht-ischämische Herzen noch in ischämische Herzen (Abb. 3-25).

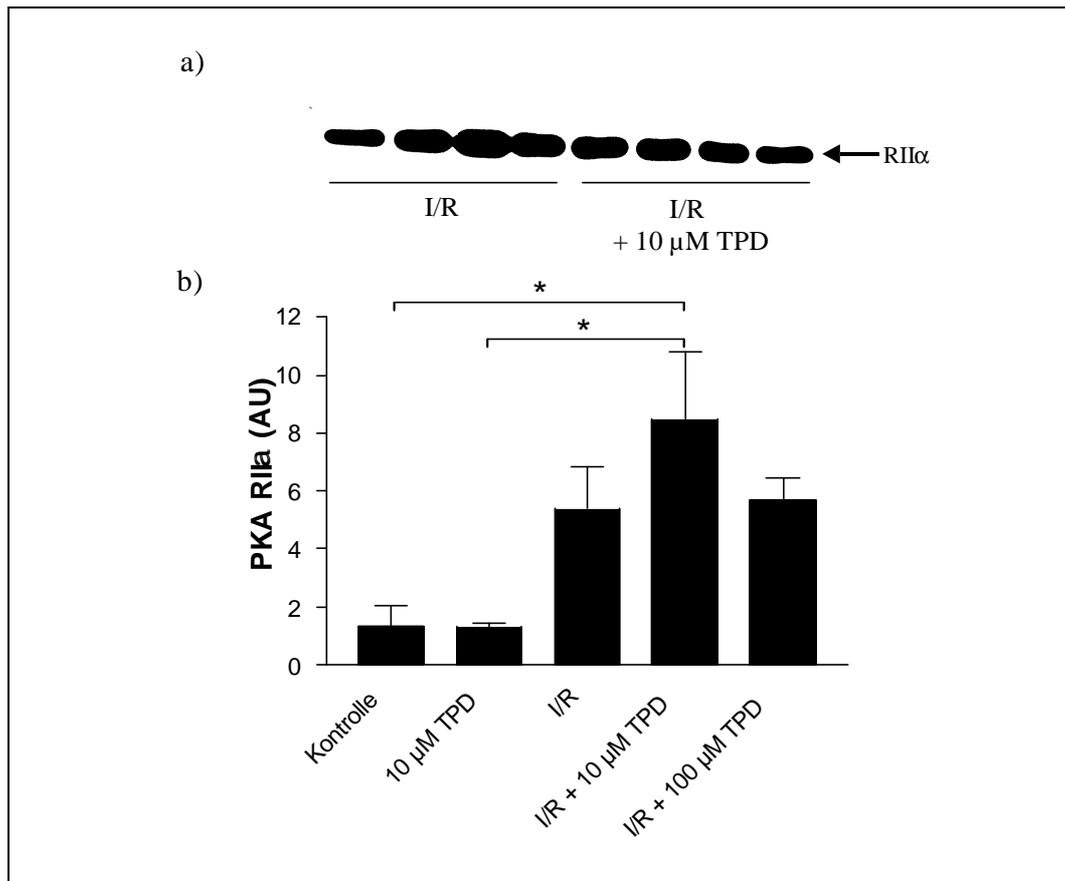


Abbildung 3-25: Regulatorische Untereinheit II α der PKA in Mäuse-Herzen unter den verschiedenen Versuchsbedingungen. a) Western-Blot mit den Versuchsbedingungen I/R und I/R + 10 μ M Trapidil (TPD). Gezeigt sind jeweils vier Protein-Proben aus unterschiedlichen Herzen. b) Densitometrische Auswertung der Western-Blots. Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 5 - 8 Herzen pro Gruppe. * $p < 0.05$.

Bei Betrachtung der Expression der Cy unter den verschiedenen Versuchsbedingungen zeigte sich zunächst, dass I/R zu einer Abnahme der Protein-Menge führt. Trapidil zeigte in einer Konzentration von 10 μ M keinerlei Einfluss auf die Expression von Cy in nicht-ischämischen Herzen. Hingegen normalisiert sich die Expression von Cy bei ischämischen Herzen unter der Zugabe von Trapidil. Hierbei zeigte sich kein Unterschied in einer Behandlung mit 10 μ M bzw. 100 μ M Trapidil (Abb. 3-26).

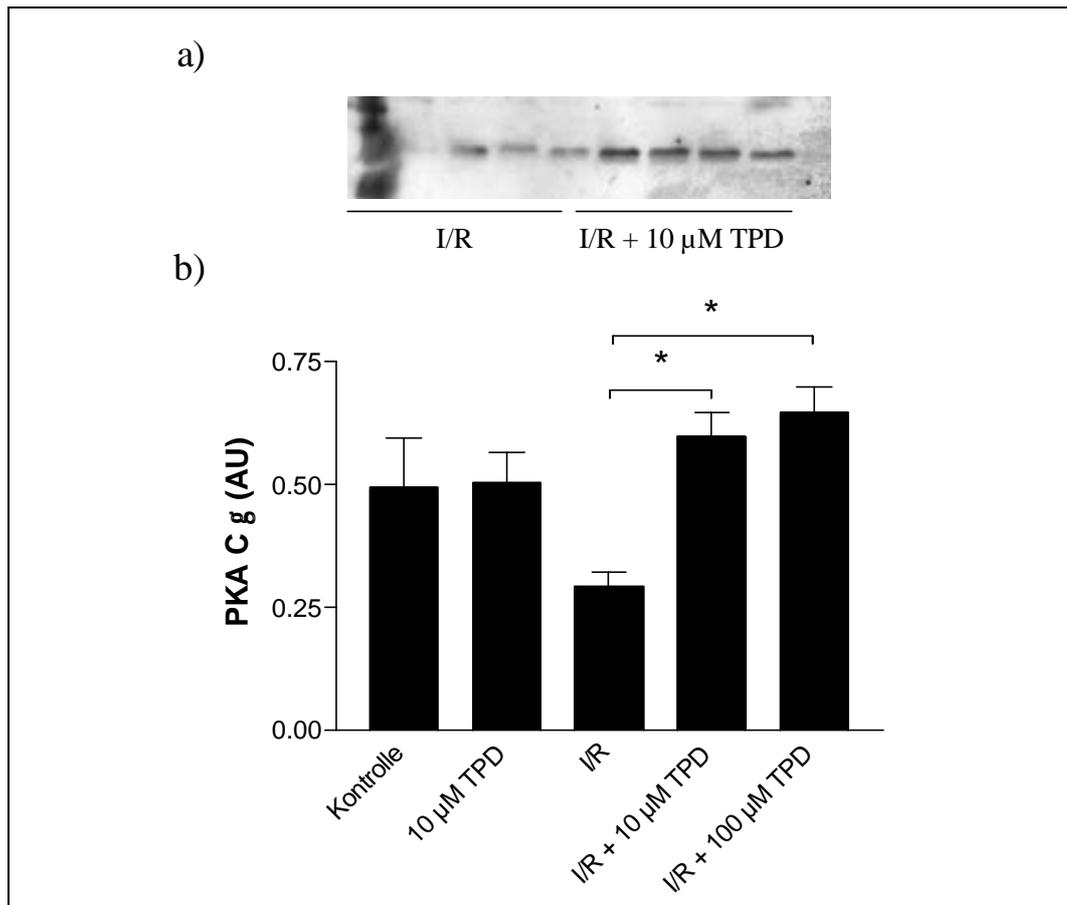


Abbildung 3-26: Katalytische Untereinheit γ der PKA in Mäuse-Herzen unter den verschiedenen Versuchsbedingungen. a) Western-Blot mit den Versuchsbedingungen I/R und I/R + 10 μ M Trapidil (TPD). Gezeigt sind jeweils vier Protein-Proben aus unterschiedlichen Herzen. b) Densitometrische Auswertung der Western-Blots. Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 5 - 8 Herzen pro Gruppe. * $p < 0.05$.

3.3 Versuche zur Modulation der PKA-Aktivität mit Trapidil

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob Trapidil ein direkter Aktivator der PKA ist. Hierzu wurden Versuche in einem Zell-freien System durchgeführt. Zunächst wurden Versuche mit einem käuflichen PKA-Holoenzym der Firma Sigma (#P5511, Sigma, Deisenhofen) durchgeführt. Diese PKA wurde laut Katalog-Angaben nach dem Protokoll von Gilman et al. (1970) aus Rinder-Herzen aufgereinigt und zeigte eine Aktivität von 1 – 2 U/ μ g Protein. In diesen Versuchen mit dem nicht-radioaktiven Assay von Calbiochem (#539484, Calbiochem, San Diego, USA) sollte zunächst noch einmal eine Aktivierung dieser PKA durch Trapidil gezeigt werden. Hierzu wurden 2 μ M cAMP und 100 μ M Trapidil eingesetzt. In allen durchgeführten Experimenten zeigte die Sigma-PKA eine sehr niedrige Grundaktivität, was anzeigt, dass praktisch kein Zerfall des Holoenzym in regulatorische und katalytische Untereinheit vorliegt. Unter 2 μ M cAMP kommt es zu einer signifikanten Erhöhung der PKA-Aktivität um den Faktor 3 bis 7. Unter der alleinigen Zugabe von 100 μ M Trapidil kommt es ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme der Enzym-Aktivität in allen unabhängigen Experimenten jeweils um etwa den Faktor 2. Bei Kombination von Trapidil und cAMP kommt es zu einer gegenüber der cAMP-Wirkung weiteren Steigerung der Enzym-Aktivität (Abb. 3-27).

Aufgrund der Präparations-Methode der Sigma-PKA konnte nicht ausgeschlossen werden, dass noch geringe Mengen cAMP in dem lyophilisierten Pulver vorhanden waren. Um nun zu klären, ob es sich bei dem beobachteten Effekt von Trapidil um eine direkte Aktivierung der PKA oder aber um eine 'Sensibilisierung' gegenüber dem möglicherweise vorhandenen restlichen cAMP handelt, wurden cAMP-freie Holoenzyme (ohne freies und Protein-gebundenes cAMP) in dem Zell-freien Assay untersucht. Diese Holoenzyme wurden aus rekombinanten PKA-Untereinheiten (katalytisch: C α ; regulatorisch: RI α , RII α und RII β) direkt vor den Versuchen geformt. Um weiterhin zu klären, ob es sich um einen Isoform-selektiven Effekt handelt, wurden Holoenzyme eingesetzt, die jeweils ausschließlich RI α , RII α oder RII β (in der Folge bezeichnet als PKAI α , PKAII α bzw. PKAII β) enthielten.

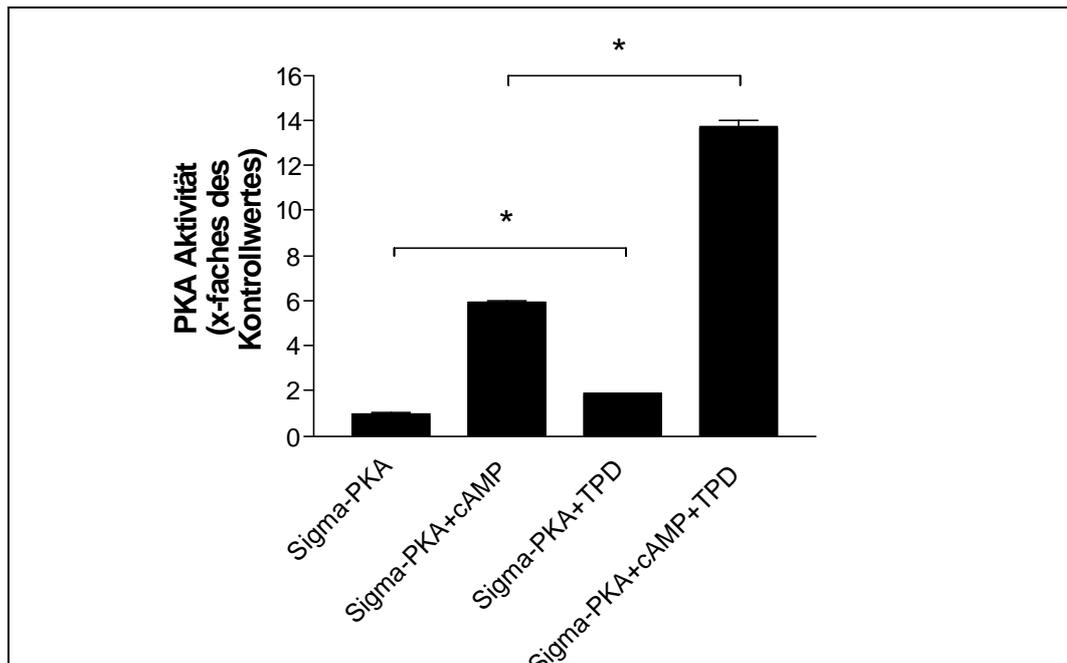


Abbildung 3-27: Aktivierung der Sigma-PKA mit 2 μM cAMP oder 100 μM Trapidil (TPD) oder einer Kombination beider Substanzen. Die PKA-Aktivität wurde über die Phosphorylierung eines PKA-Pseudosubstrats mittels photometrischem Assay gemessen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus 3 unabhängigen Experimenten, durchgeführt als Doppelbestimmungen. Daten sind x-fache Erhöhung der Enzymaktivität im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle und sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0.05$.

Für alle drei Holoenzyme konnte gezeigt werden, dass die im Assay gemessene Grundaktivität sehr niedrig war. Das bedeutet, dass in allen Fällen die Bildung des Holoenzym aus katalytischer und regulatorischer Untereinheit nahezu vollständig abgelaufen ist. Für alle drei Holoenzyme konnte weiterhin in diesem Assay kein direkter Effekt von 100 μM Trapidil auf die Aktivität gezeigt werden. Für die beiden PKAII-Holoenzyme hingegen konnte eine signifikante Zunahme der Aktivität bei Kombination von 2 μM cAMP und 100 μM Trapidil im Vergleich zu Versuchen, in denen ausschließlich 2 μM cAMP eingesetzt wurden, gezeigt werden. Dies zeigt, dass die Aktivität von PKAII α und PKAII β durch Trapidil gesteigert wird, und dass dieser Effekt die Anwesenheit physiologischer Konzentrationen von cAMP erfordert. In vier unabhängigen Experimenten, durchgeführt als Doppelbestimmungen, konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Im Durchschnitt zeigte sich, dass die Aktivierung von PKAII β ausgeprägter zu sein schien als die Aktivierung von PKAII α (Abb. 3-28).

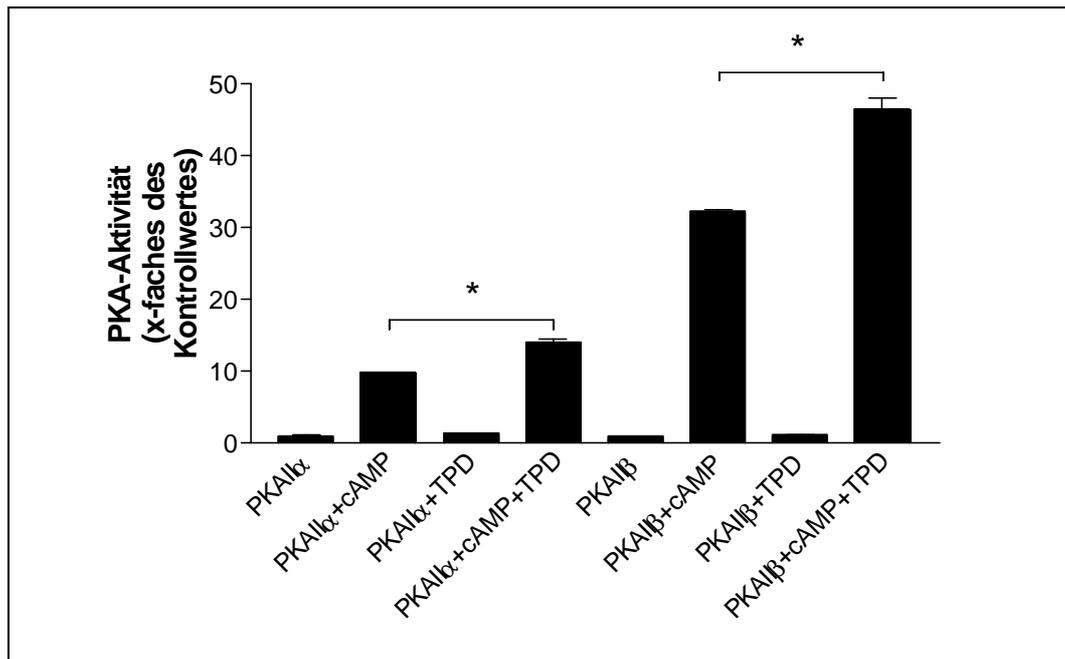


Abbildung 3-28: Aktivierung der cAMP-freien Holoenzyme PKAI α und PKAI β mit 2 μ M cAMP oder 100 μ M Trapidil (TPD) oder einer Kombination beider Substanzen. Die PKA-Aktivität wurde über die Phosphorylierung eines PKA-Pseudosubstrats mittels photometrischem Assay gemessen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus 4 unabhängigen Experimenten, durchgeführt als Doppelbestimmungen. Daten sind \times -fache Erhöhung der Enzymaktivität im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle und sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0.05$.

Für die PKAI α konnte keine solche Veränderung der Phospho-Transfer-Aktivität zwischen den Ansätzen, in denen nur cAMP oder aber eine Kombination von Trapidil und cAMP eingesetzt wurde, festgestellt werden. Dies konnte in drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt als Doppelbestimmung, bestätigt werden (Abb. 3-29).

In einem weiteren Experiment konnte gezeigt werden, dass 2 μ M cAMP nicht in der Lage waren, die in den beschriebenen Experimenten eingesetzte Menge an PKAI α vollständig zu aktivieren. Die konzentrationsabhängige Aktivierung von PKA durch cAMP wurde mit fünf unterschiedlichen cAMP-Konzentrationen zwischen 3 nM und 30 μ M durchgeführt. Dabei waren 3 nM cAMP nicht in der Lage, eine Aktivierung der PKA herbeizuführen. Unter 30 nM cAMP kommt es zu einer ersten Aktivierung des Enzyms. Die höchste hier eingesetzte Konzentration von 30 μ M cAMP aktivierte in diesem Assay die PKAI α mehr als 3 μ M cAMP (Abb. 3-30). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich für PKAI α und PKAI β . Dies zeigte, dass die ausbleibende Aktivierung von PKAI α bei Kombination von 100 μ M Trapidil mit 2 μ M cAMP nicht auf eine bereits vollständige Aktivierung der PKA zurückzuführen ist.

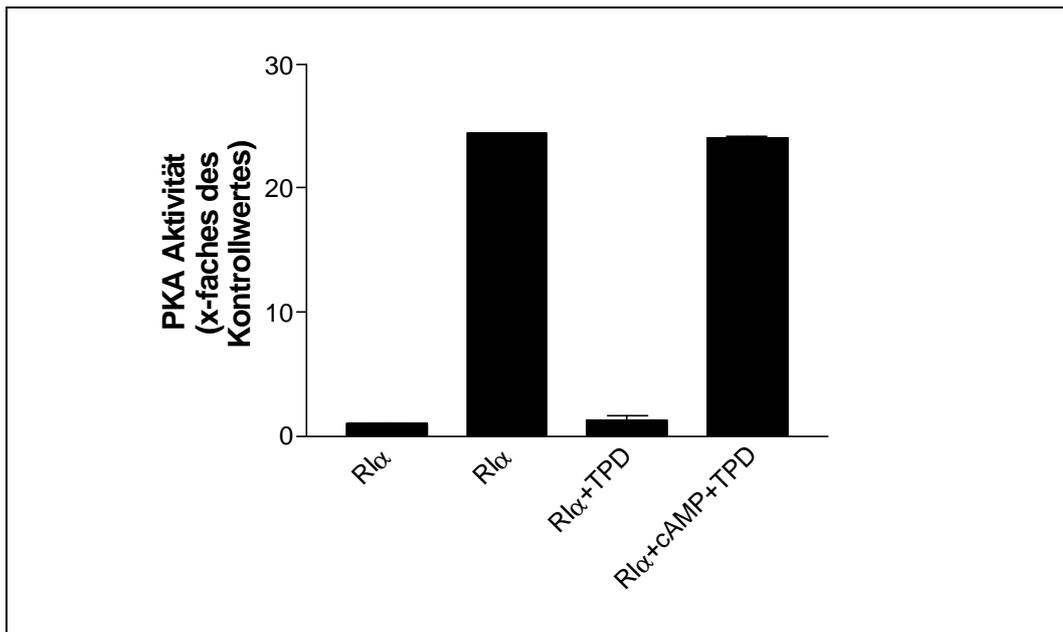


Abbildung 3-29: Aktivierung des cAMP-freien Holoenzym PKA α mit 2 μ M cAMP oder 100 μ M Trapidil (TPD) oder einer Kombination beider Substanzen. Die PKA-Aktivität wurde über die Phosphorylierung eines PKA-Pseudosubstrats mittels photometrischem Assay gemessen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus 3 unabhängigen Experimenten, durchgeführt als Doppelbestimmungen. Daten sind x-fache Erhöhung der Enzymaktivität im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle und sind Mittelwerte \pm SEM.

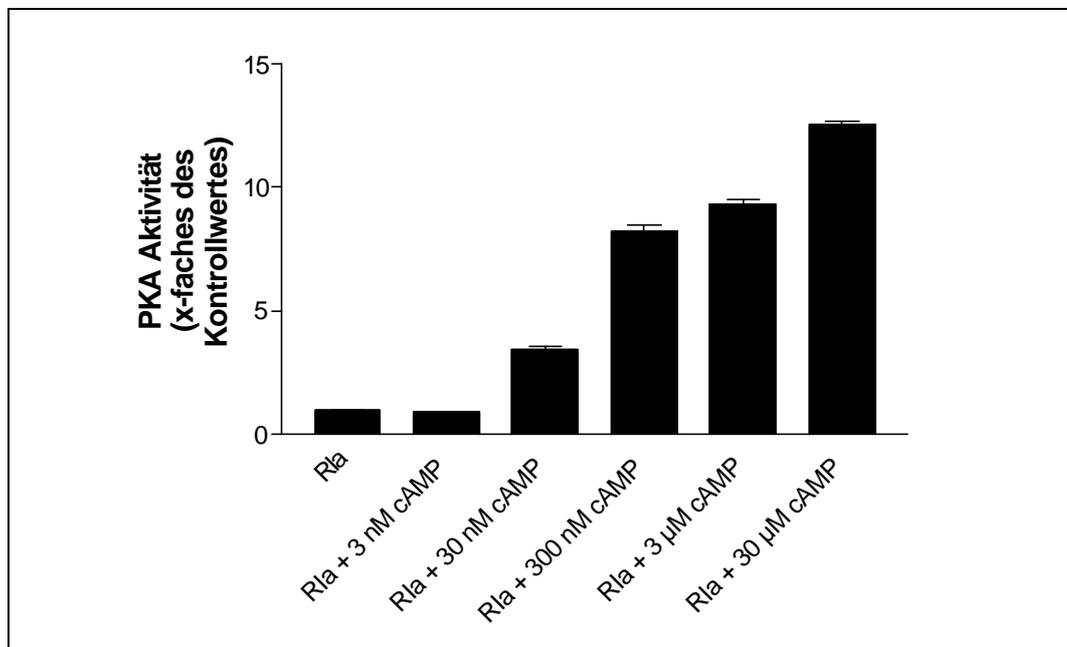


Abbildung 3-30: Konzentrationsabhängige Aktivierung von PKA α durch cAMP. Die PKA-Aktivität wurde über die Phosphorylierung eines PKA-Pseudosubstrats mittels photometrischem Assay gemessen. Das Experiment wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. Daten sind x-fache Erhöhung der Enzymaktivität im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle und sind Mittelwerte \pm SEM.

4. Diskussion

Das Myokard ist in der Lage, kurze Perioden schwerer oder sogar vollständiger Ischämie ohne Tod von Kardiomyozyten zu überstehen. Der an den Kardiomyozyten entstehende ischämische Schaden ist durch eine schnelle arterielle Reperfusion praktisch vollständig reversibel. Solche transienten Phasen myokardialer Ischämie finden sich zum Beispiel bei Angina pectoris oder der Ballon-Angioplastie und gehen nicht einher mit myokardialem Zelltod (Kloner und Jennings, 2001 A; Kloner und Jennings, 2001 B). Mit steigender Dauer und Schwere der Ischämie kann jedoch die nachfolgende Reperfusion zu einem Phänomen führen, welches als Reperfusionsschaden bezeichnet wird (Yellon und Baxter, 2000). Die Reperfusion von geschädigtem Myokard führt in diesem Falle nicht mehr zu einer Erholung der Myozyten, sondern führt zu einer 'Demaskierung' des ischämischen Schadens. Für diesen Reperfusionsschaden wurden verschiedene Mediatoren und Mechanismen beschrieben. Zu den wichtigsten gehören dabei freie Sauerstoff-Radikale (Bolli et al., 1989), starke Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Gross et al., 1999), endotheliale und mikrovaskuläre Dysfunktion (Granger, 1999; Carden und Granger, 2000) sowie Veränderungen des myokardialen Metabolismus (Rao et al., 2001; Merante et al., 1998).

In den letzten Jahrzehnten wurden viele verschiedene pharmakologische Ansätze zur Limitierung des ischämischen Schadens entwickelt. Eine Substanz, die sich auch in klinischen Studien bewährt hat, ist Trapidil (Rocornal[®]). So zeigte sich bei Patienten mit stabiler Angina pectoris eine signifikante Verbesserung der Herzleistung sowie Verminderung der Schmerz-Attacken (Raubach et al., 1997). In der Langzeit-Studie JAMIS (Japanese Antiplatelets Myocardial Infarction Study) zeigte sich bei Patienten nach akutem Myokardinfarkt eine signifikante Reduktion der Häufigkeit kardiovaskulärer Ereignisse (Yasue et al., 1999). Trotz dieser positiven Befunde blieb jedoch der Wirkmechanismus der Substanz weitgehend unklar.

In dieser Arbeit stand die Frage nach dem anti-ischämischen Wirkmechanismus von Trapidil im Vordergrund. Zur Erörterung dieser Frage wurde zunächst ein bereits etabliertes Langendorff-Modell mit Kaninchen Herzen eingesetzt. An diesem Modell konnte in dieser Arbeitsgruppe bereits die kardioprotektive Wirkung von Trapidil gezeigt werden (Schrör et al., 1998). Das kardioprotektive Potential von Trapidil konnte durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche, bei denen Trapidil durchgängig appliziert wurde, bestätigt werden.

Die für die normothermische Ischämie notwendige Reduktion der Perfusionsrate führt in den Herzen zu charakteristischen Merkmalen, d.h. Zunahme des LVEDP, Reduktion des Δ LVP, Verringerung der HF sowie Reduktion der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit. Der sich während der Reperfusion manifestierende Schaden zeigte sich in einer weiterhin stark erhöhten diastolischen Wandspannung des Ventrikels, einer starken Freisetzung von CK und signifikant verminderter Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit. Trapidil konnte in der eingesetzten Konzentration von 10 μ M die I/R-induzierten Veränderungen im Falle des LVEDP und der CK-Freisetzung vermindern bzw. im Falle der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit nahezu vollständig aufheben. Dabei ist eine Konzentration von 10 μ M im Bereich der Plasma-Konzentration *in vivo* nach oraler Gabe therapeutischer Dosen von Trapidil (Harder et al., 1996).

Einer der wichtigsten Mediatoren des Reperfusionsschadens des Herzens ist eine Störung der Ca^{2+} -Homöostase, d.h. eine starke Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Gross et al., 1999; Przylenk et al., 1999). Diese Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist zurückzuführen auf eine verminderte Aufnahme von Ca^{2+} in das SR infolge einer Reduktion der PKA-abhängigen Phosphorylierung von PLB (Schoutsen et al., 1989; Netticadan et al., 1999). Aufgrund früherer Untersuchungen an diesem Institut wurde postuliert, dass Trapidil ein direkter Aktivator der PKA ist, da die Substanz das aufgereinigte Enzym in einem Zell-freien System ohne Zusatz von cAMP aktiviert hat (Bönisch et al., 1998). Aufgrund dieser beschriebenen Mechanismen wurde untersucht, ob die PKA-abhängige Phosphorylierung von PLB durch die Gabe von Trapidil beeinflussbar ist.

Für die Untersuchung der PLB-Phosphorylierung wurde ein phosphospezifischer Antikörper verwendet. Drago und Colyer (1994) beschrieben zwei polyklonale Antikörper, PS-16 und PT-17, die an PLB binden, welches an Ser¹⁶ phosphoryliert ist (PKA-spezifische Phosphorylierung) bzw. an Thr¹⁷ phosphoryliert ist (Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Kinase-spezifische Phosphorylierung). Eine nachfolgende weitere Charakterisierung der Antikörper ergab, dass der Antikörper PS-16 nur an PLB bindet, welches ausschließlich an Ser¹⁶ phosphoryliert ist. Der Antikörper ist nicht in der Lage an PLB zu binden, welches gleichzeitig an Ser¹⁶ und an Thr¹⁷ phosphoryliert ist (Colyer, 1998). Daher können alle Änderungen im Status der PLB-Phosphorylierung, die mit dem Antikörper PS-16 gezeigt werden, einer Veränderung der PKA-Aktivität zugeschrieben werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass es bei I/R unter Trapidil-Behandlung zu einer signifikant verbesserten PKA-abhängigen PLB-Phosphorylierung im Vergleich zu unbehandelten Herzen kommt. Dies legt eine erhöhte SERCA-Aktivität und damit eine gesteigerte Ca^{2+} -Aufnahme in das SR nahe. Aus einer solchen gesteigerten Aufnahme von Ca^{2+} in das SR könnte eine Verminderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration folgen. Dies wäre in Übereinstimmung mit den an den Herzen gemessenen funktionellen Parametern. Es kommt unter Trapidil zu einer signifikanten Reduktion der diastolischen Kontraktur am Ende der ischämischen Phase sowie einer immer noch deutlichen Reduktion im Verlaufe der Reperfusion. Auch die CK-Freisetzung ist unter Trapidil signifikant verringert. Die signifikant erhöhte Relaxationsgeschwindigkeit am Ende der Reperfusion ist ein deutliches Indiz für eine im Vergleich zu unbehandelten I/R-Herzen verbesserte Sequestrierung des zytosolischen Ca^{2+} . Auffällig ist die Normalisierung der Kontraktionsgeschwindigkeit unter Trapidil-Behandlung. Dies legt nahe, dass auch die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR über den Ryanodin-Rezeptor erhöht ist. Es ist beschrieben, dass eine Phosphorylierung des Ryanodin-Rezeptors über PKA dessen Offenwahrscheinlichkeit erhöht. Zum gleichen Effekt führt die PKA-abhängige Phosphorylierung des 'FK506 binding protein' (FKBP12.6). Dieses Protein gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die den Ryanodin-Rezeptor stabilisieren. Phosphorylierung des FKBP12.6 führt zu einer Dissoziation dieses Proteins aus dem Ryanodin-Rezeptor-Komplex und einer Erhöhung des Ca^{2+} -Ausstroms aus dem SR (Marx et al., 2000). Eine Überprüfung dieser Möglichkeiten fand jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht statt. Eine weitere Möglichkeit, wie es zu einer Erhöhung der Kontraktionsgeschwindigkeit kommen kann, besteht in einer Verstärkung der Aufnahme von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum zu Beginn der Systole, welche eine Verstärkung der Ca^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR nach sich ziehen würde. Auch diese Möglichkeit konnte hier nicht verifiziert werden. Weitere Faktoren, die bei einer verringerten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu einer Verminderung des Reperfusions-Schadens beitragen können, sind die reduzierte Aktivierung schädlicher Ca^{2+} -abhängiger Enzyme, wie z.B. Proteasen, Hydrolasen, Lipasen und Phospholipasen (Tolnai und Korecky, 1986; McCord et al., 1985; Bolli et al., 1983; Farber et al., 1981), sowie verminderter mechanischer Stress der Myozyten (Downing, 1993).

Obwohl die Ca^{2+} -Homöostase in I/R-Herzen unter Trapidil-Zugabe möglicherweise als verbessert betrachtet werden kann und somit aufgrund der erhöhten Sequestrierungsrate des zytosolischen Ca^{2+} auch ein größerer Ca^{2+} -Transient an der SR-Membran erwartet werden

könnte, konnte kein Effekt von Trapidil auf den Δ LVP beobachtet werden. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass in keiner der verschiedenen Versuchsgruppen eine signifikante kontraktile Dysfunktion auftrat.

Es wurde keine Änderung des CPP im Vergleich aller Versuchsgruppen beobachtet. Dies zeigt deutlich, dass die kardioprotektiven Eigenschaften von Trapidil unabhängig von Änderungen der koronaren Perfusion des Herzens sind. Die in der Literatur selten beschriebene Koronardilatation bei höheren Trapidil-Konzentrationen scheint auf einer PDE-Hemmung zu beruhen und erfordert Konzentrationen von $\geq 300 \mu\text{M}$ (Bethke et al., 1991; Mazurov et al., 1984).

Am Ende des Versuchsprotokolls war, unbeeinflusst von Trapidil, die Herzfrequenz der ischämischen Kaninchen-Herzen gegenüber den nicht-ischämischen Herzen leicht erhöht. Dies ist möglicherweise auf die erhöhte Freisetzung von Katecholaminen in I/R-Herzen zurückzuführen (Schrör und Funke, 1985; Schömig et al., 1984).

Es ist interessant, dass Trapidil zwar im Kaninchen-Herzen die PLB-Phosphorylierung an Ser¹⁶ und damit die PKA-Aktivität in I/R-Herzen signifikant erhöht, nicht aber zu einer Erhöhung der PLB-Phosphorylierung über Kontroll-Niveau in nicht-ischämischen Herzen führt. Osada et al. (1998) berichteten, dass es nach 30 min Ischämie mit nachfolgender 30minütiger Reperfusion in Ratten-Herzen zu einer Reduktion der Menge von SERCA kommt. In einer späteren Publikation aus der gleichen Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass in Ratten-Herzen nach 30 min Ischämie und nachfolgender 60minütiger Reperfusion die Menge von SERCA2a um 72% reduziert war. Im Gegensatz hierzu blieb die Menge von PLB mit einer nur leichten Reduktion um 14% nahezu unverändert (Temsah et al., 1999). Diese nahezu unveränderte Expression ist in Übereinstimmung mit den im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen. In den hier durchgeführten Western-Blots ergab sich keine offensichtliche Änderung des PLB-Gehalts zwischen den Herzen aus den verschiedenen Versuchsgruppen. Diese beschriebene signifikant höhere PLB/SERCA-Ratio in I/R-Herzen könnte an der I/R-spezifischen Wirkung von Trapidil beteiligt sein.

Als Hauptmetabolite der Arachidonsäure während Ischämie und Reperfusion werden Prostacyclin und in wesentlich geringerem Maße Prostaglandin E₂ gebildet (Schrör et al., 1977). Während der ersten Minuten der Reperfusion kommt es bei isolierten I/R-Herzen zu

einer signifikant erhöhten Freisetzung von Prostacyclin in das Effluat (Engels et al., 1990). Dies ließ sich auch in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen bestätigen. Ein signifikanter Einfluss von 10 μM Trapidil auf die Freisetzung von Prostacyclin aus Kaninchen-Herzen war nicht zu beobachten. Dieses Ergebnis zeigte, dass die Wirkung von Trapidil nicht auf einer Modulation der Prostacyclin-Freisetzung beruht.

Eine weitere Versuchsreihe im Rahmen dieser Arbeit konnte zeigen, dass in diesem I/R-Modell des isolierten Kaninchen-Herzens die Gabe von 10 μM Trapidil ausschließlich während der Reperfusion nicht ausreichend für eine signifikante kardioprotektive Wirkung der Substanz ist. Um vergleichbare Ausgangsbedingungen vor Beginn der Reperfusion zu erreichen, wurden in die Auswertung nur Versuche einbezogen, die eine ischämische Kontraktur von > 10 mm Hg aufwiesen. Trapidil bei Reperfusion in einer Konzentration von 10 μM zeigte auf keinen der funktionellen Parameter (HF, CPP, ΔLVP , LVEDP, $-\text{dp}/\text{dt}$ und $+\text{dp}/\text{dt}$) einen Einfluss im Vergleich zu unbehandelten I/R-Herzen. Zwar konnte eine gewisse Verminderung der CK-Freisetzung bei den Trapidil-behandelten Herzen beobachtet werden, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Zumindest in diesem I/R-Modell war die Anwesenheit von Trapidil während der ischämischen Phase also notwendig, um das volle kardioprotektive Potential der Substanz auszuschöpfen. Eine mögliche Ursache hierfür liegt in der während der Ischämie im Vergleich zu I/R-Herzen unverändert hohen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, welche zu einer Schädigung des Myokards führen kann.

In einer Versuchsreihe, in der der Proteinsynthese-Hemmstoff Cycloheximid eingesetzt wurde, sollte überprüft werden, ob eine Proteinneusynthese zur beobachteten kardioprotektiven Wirkung von Trapidil beiträgt. Cycloheximid hemmt selektiv die Peptidyltransferase-Aktivität von 60S-Ribosomen-Untereinheiten und ist somit Eukaryoten-spezifisch. Die Ergebnisse der Versuche zeigten, dass Cycloheximid in der eingesetzten Konzentration von 10 μM deutlich kardioprotektiv bei I/R-Herzen wirkte. Im Vergleich zu unbehandelten I/R-Herzen zeigte sich ein signifikant verringerter LVEDP sowie eine deutliche, aber nicht signifikante, Reduktion der CK-Freisetzung. Aus der Literatur ist bekannt, dass Cycloheximid den ischämischen Schaden an neuronalen Zellen deutlich verringert. Bei *in vivo*-Versuchen mit Ratten konnten Kato et al. (1997) zeigen, dass Cycloheximid sowohl die Zahl der apoptotischen als auch der nekrotischen Neurone nach induzierter Rückenmarks-Ischämie signifikant reduzierte. Goto et al. (1990) konnten ähnliches ebenfalls in einem *in vivo*-Modell bei Ratten zeigen. Auch hier zeigte sich bei einer

transienten Ischämie des Vorderhirns eine signifikante Abnahme der Anzahl nekrotischer Neurone unter 10 μ M Cycloheximid. Bei der Kombination von Trapidil mit Cycloheximid konnte in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen kein Unterschied zu der nur mit Cycloheximid behandelten Gruppe festgestellt werden. Aufgrund der protektiven Eigenwirkung von Cycloheximid, die nahe an die protektive Wirkung von durchgängig appliziertem Trapidil heranreicht und somit keine Unterscheidung von dieser Gruppe mehr zulässt, kann durch dieses Versuchs-Design nicht geklärt werden, ob eine Proteinneusynthese zur kardioprotektiven Wirkung von Trapidil beiträgt.

Im Rahmen der Ergebnisse aus den Kaninchen-Versuchen wurde nach weiteren Wegen gesucht, den Wirkmechanismus von Trapidil bei I/R aufzuklären. Als geeignetes Modell erschien hier das Langendorff-Modell mit Mäuse-Herzen. Es wurde dieses Modell gewählt mit Blick auf bereits existierende transgene Maus-Linien, deren Untersuchung zukünftig neue Erkenntnisse liefern soll. Im Blickpunkt dieser zukünftigen Untersuchungen stehen vor allem die bereits in der Literatur beschriebenen PLB-knockout-Mäuse (Luo et al., 1994) und PKA $RII\alpha$ -knockout-Mäuse (Burton et al., 1997). Die Nennung der letzteren Maus-Linie ergibt sich aus den später diskutierten Versuchen zur Aktivierung von PKA durch Trapidil in einem Zell-freien System sowie Western-Untersuchungen zu den beschriebenen Mäuse-Versuchen. Um die Voraussetzung für diese Versuche zu schaffen musste zunächst das Langendorff-Modell für Mäuse-Herzen etabliert werden und anschließend gezeigt werden, dass Trapidil auch bei der Spezies Maus in einem I/R-Modell kardioprotektiv wirkt.

Das Langendorff-Modell für Mäuse wurde in Anlehnung an das von Sumeray und Yellon (1998) beschriebene Modell aufgebaut. Nach Schaffung der technischen Voraussetzungen musste eine geeignete Ischämie-Zeit für ein I/R-Modell gefunden werden. Als Kriterium für eine geeignete Ischämie-Zeit wurde eine Erholung des Δ LVP am Ende der 45minütigen Reperfusion-Phase von etwa 50% im Vergleich zur Kontrolle angesehen. Bei den Ischämie-Zeiten 50 min und 60 min wurde dieses Kriterium erfüllt. Bei diesen beiden Gruppen zeigten sich praktisch keine Unterschiede in nahezu allen Parametern. Nur bei der CK-Aktivität im Effluat der Herzen am Ende der Reperfusion wurden bei 60minütiger Ischämie nicht signifikant, aber deutlich höhere Werte gemessen, trotz etwas geringerer diastolischer Kontraktur im Vergleich zu 50minütiger Ischämie. Es wurde daher entschieden, alle nachfolgenden Versuche mit einer Ischämie-Zeit von 60 min durchzuführen. Auffällig war ein mittels TTC-Färbung festgestellter geringer Anteil von 6% nekrotischen Gewebes in

Kontroll-Herzen, welcher wahrscheinlich über geringfügige Luft- oder Staubembolien zu erklären ist.

Die Einleitung einer Ischämie hatte auf die Mäuse-Herzen ganz ähnliche Folgen wie auf die Kaninchen-Herzen. Allerdings zeigten sich bei den Mäusen Kennzeichen eines deutlich schwereren ischämischen Schadens. So kam es auch zu einer deutlichen diastolischen Kontraktur, die jedoch im Gegensatz zu den Kaninchen-Herzen mit Beginn der Reperfusion stark zunahm und schließlich im Laufe der Reperfusion stetig abnahm. Weiterhin kam es mit einsetzender Ischämie zu einer substanziellen Abnahme des ΔLVP , welcher sich aber im Gegensatz zu den Kaninchen im Laufe der Reperfusion nicht annähernd so deutlich erholte. Ebenso war die CK-Freisetzung pro min und g Gewebe am Ende der Reperfusion bei einer Ischämie-Dauer von 60 min um etwa den Faktor 4 höher als bei den beschriebenen Kaninchen-Versuchen.

Es zeigte sich, dass 100 μM Trapidil bei den Mäuse-Herzen bereits zum Zeitpunkt $t = 0$ min, welches bei den Mäuse-Versuchen im Gegensatz zu den Kaninchen-Versuchen auch einer Äquilibration in Anwesenheit von Trapidil entspricht, signifikante Effekte auf die Herzen hatten. Die signifikante Erhöhung des Koronarflusses sowie des ΔLVP deuten bereits in dieser relativ geringen Konzentration auf eine PDE-Hemmung und nachfolgend einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels hin. Ebenso sprechen hierfür die signifikante Erhöhung der Kontraktions- und der Relaxationsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt $t = 0$ min. Dies erscheint ungewöhnlich, da aufgrund von Literaturangaben davon ausgegangen wird, dass sich ein solcher Effekt der PDE-Hemmung erst bei Konzentrationen von $\geq 300 \mu M$ Trapidil einstellt (Bethke et al., 1991; Mazurov et al., 1984). Diese beobachteten Effekte änderten sich bei nicht-ischämischen Herzen bis zum Ende des Versuchsprotokolls zum Zeitpunkt $t = 105$ min. Zwar blieb bei mit 100 μM Trapidil behandelten nicht-ischämischen Herzen der Koronarfluss und die Relaxationsgeschwindigkeit deutlich und der ΔLVP leicht erhöht, jedoch wies die Kontraktionsgeschwindigkeit keinerlei Unterschied mehr im Vergleich zur Kontrolle auf. Warum sich diese Änderungen einstellten, konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Trapidil war in einer Konzentration von 100 μM bei Mäuse-Herzen in der Lage, den LVEDP in der zweiten Hälfte der Ischämie signifikant im Vergleich zu Kontroll-Herzen zu senken. Hingegen unterschied sich der unter dem Einfluss von 10 μM Trapidil im Verlaufe der

Ischämie gemessene LVEDP nicht signifikant von den Werten der Kontroll-Herzen. Allerdings sind beide eingesetzte Konzentrationen von Trapidil während der Reperfusion in der Lage, den LVEDP etwa in gleichem Maße zu senken. Dies steht im Gegensatz zu den bei den Kaninchen beobachteten Effekten von 10 μM Trapidil. Dies mag darin begründet liegen, dass es sich bei der bei Mäusen induzierten Ischämie um eine 'zero-flow'-Ischämie und bei den Kaninchen um eine 'low-flow'-Ischämie handelt. Die Akkumulation metabolischer Endprodukte ist ein Charakteristikum der myokardialen Ischämie. Dabei kommt es neben Adenosin-, H^+ - und Laktatbildung auch zur Produktion von Ammonium und Alanin (Cobbe und Poole-Wilson, 1980; Lange et al., 1983). Vor allem Laktat und Azidose verstärken die Schädigung der Kardiomyozyten. Hohe Laktat-Konzentrationen führen zur mitochondrialen Schwellung (Armiger et al., 1975) und die intrazelluläre Azidose führt über einen $\text{Na}^+\text{-H}^+$ - und konsekutiven $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austausch zu einer Ca^{2+} -Überladung der Zellen. Ein geringer Restfluss ermöglicht jedoch in gewissem Maße die Auswaschung von Laktat und H^+ . Daher waren 10 μM Trapidil möglicherweise nicht mehr in der Lage, die aufgrund der Akkumulation metabolischer Endprodukte verstärkte Schädigung des Myokards soweit zu kompensieren, dass sich eine Senkung des LVEDP ergab. Hierfür spricht auch, dass sich mit einsetzender Reperfusion eine deutliche Reduktion des LVEDP im Vergleich zur Kontrolle einstellte.

Die in Anwesenheit von 10 μM Trapidil gemessene Reduktion des LVEDP und die Annäherung der Relaxations- und Kontraktionsgeschwindigkeit sowie des ΔLVP an das Niveau der Kontroll-Herzen weisen auch bei den Mäusen auf einen mit dem Kaninchen-Modell identischen Mechanismus hin. Auch hier kommt es zumindest zu einem großen Teil zu einer Normalisierung der Parameter über eine Modulation des Ca^{2+} -Haushaltes. In der Folge führte 10 μM Trapidil, ebenso wie 100 μM Trapidil, zu einer massiven Reduktion der I/R-induzierten Freisetzung von CK. Trapidil hat sich also auch in diesem I/R-Modell in einer Konzentration von 10 μM als sehr effektiv kardioprotektiv wirkende Substanz erwiesen. Die bei einer Konzentration von 100 μM gegenüber 10 μM Trapidil gemessene geringfügige weitere Verbesserung der Parameter ΔLVP , CK-Freisetzung sowie Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit ist möglicherweise auf die Beeinflussung des Koronarflusses zurückzuführen. Der signifikant erhöhte Koronarfluss führte zu einer besseren Versorgung des Myokards mit Sauerstoff und Nährstoffen.

Da bereits aufgrund der Daten früherer Untersuchungen an diesem Institut postuliert wurde, dass Trapidil ein direkter Aktivator der PKA ist (Bönisch et al., 1998), stand nun die Fragen im Mittelpunkt, welche Isoformen der regulatorischen bzw. katalytischen Untereinheit der PKA im Myokard der Mäuse vorkommen und ob diese möglicherweise in diesem I/R-Modell einer Regulation durch I/R und/oder Trapidil unterliegen. Die hierzu mit verschiedenen Vergleichs-Geweben (bovin, human, murin) durchgeführten Western-Blots zeigten, dass sich von den vier regulatorischen Untereinheiten nur die RII α nachweisen ließ. Dies ist in Übereinstimmung mit der Literatur, wo RII α als die dominante regulatorische Untereinheit im myokardialen Gewebe beschrieben wird (Skålhegg und Tasken, 2000). Obwohl auch die RI α in Mäuse-Herzen bereits nachgewiesen werden konnte (Cadd und McKnight, 1989), gelang dies im Rahmen dieser Arbeit nicht. Hingegen konnten alle drei katalytischen Untereinheiten (C α , C β , C γ) im Myokard der Maus mittels der durchgeführten Western-Blots nachgewiesen werden. Untersuchungen der RII α -Expression in den aus den Langendorff-Herzen der Mäuse gewonnen Proteinen haben gezeigt, dass I/R offensichtlich zu einer Induktion der Expression der RII α führt. Trapidil scheint diese I/R induzierte Änderung nicht zu beeinflussen. Dies bedeutet, dass offensichtlich bei I/R eine größere Menge RII α intrazellulär zur Verfügung steht. Bei der Analyse, ob auch die katalytischen Untereinheiten einer Regulation unterliegen, konnte gezeigt werden, dass die C γ unter I/R eine niedrigere Expressionsrate aufweist. Diese I/R-induzierte Änderung konnte durch Zugabe von sowohl 10 μ M als auch 100 μ M Trapidil aufgehoben werden und sogar leicht über das Niveau der Kontroll-Herzen gehoben werden. Es besteht also aufgrund dieser beiden Ergebnisse die Möglichkeit, dass bei I/R und in Anwesenheit von Trapidil mehr PKAII α -Holoenzym zur Verfügung steht im Vergleich zu unbehandelten I/R-Herzen. Auch dies könnte zur I/R-spezifischen Wirkung von Trapidil beitragen.

An dieser Stelle bekam die Frage nach der Form der Aktivierung der PKA durch Trapidil und einer möglichen Isoform-Selektivität dieser Aktivierung Bedeutung. Es gibt vier verschiedene Isoformen des PKA-Holoenzym. Unterschieden werden sie über die regulatorischen Untereinheiten (RI α , RI β , RII α und RII β). Die drei bekannten katalytischen Untereinheiten (C α , C β , C γ) haben augenscheinlich identische kinetische und physikochemische Eigenschaften (Taylor et al., 1990) und binden gleichermaßen an alle regulatorischen Untereinheiten (Skålhegg und Tasken, 2000). Die PKAI-Isoformen befinden sich vornehmlich im Zytoplasma, wohingegen die der PKAII-Isoformen überwiegend über AKAPs an intrazelluläre Strukturen und Organelle gebunden vorliegt (Colledge und Scott,

1999; Yang et al., 1998). Kranias et al. (1982) fanden eine Assoziation von PKA mit isolierten Vesikeln des kardialen SR. Diese PKA konnte als PKAII identifiziert werden. Es wurde daher geschlossen, dass die PKAII möglicherweise das Enzym ist, was für die Regulation des Ca^{2+} -Transports am SR verantwortlich ist. Eine weitere Charakterisierung der mit dem SR assoziierten PKAII-Isoform (α oder β) wurde seit dem in der Literatur nicht beschrieben. Eine andere wichtige Beobachtung für die Rolle der PKAII bei der PLB-Phosphorylierung machten Fink et al. (2001). Sie konnten eine Verringerung der PLB-Phosphorylierung sowie der kontraktile Funktion bei Kardiomyozyten unter Stimulation mit Isoproterenol zeigen, indem sie mittels eines Peptids (Ht31) die Bindung von PKAII an AKAPs kompetitiv unterbunden haben. Diese Unterbindung der PKAII/AKAP-Interaktion führte zu einer diffusen Verteilung von PKAII im Zytosol.

Die PKA phosphoryliert ein sehr breites Spektrum von Substraten. Die intrazelluläre Bindung der PKA-Isoformen an subzelluläre Strukturen über AKAPs führt zu einer Kompartimentierung und hat sich als ein wichtiger Kontrollmechanismus erwiesen, über den die PKA in der Lage ist, spezifische Phosphorylierungen innerhalb der Zelle zu vermitteln (Colledge und Scott, 1999; Colledge et al., 2000). Neuere Untersuchungen lieferten darüber hinaus Beweise dafür, dass es unter β -adrenerger Stimulation von Kardiomyozyten zu einer intrazellulären Bildung von Mikrodomänen hoher cAMP-Konzentration kommt (Zaccolo und Pozzan, 2002). Diese diskreten Mikrodomänen hoher cAMP-Konzentration finden sich auch in der Umgebung des SR. Weiterhin konnten Zaccolo und Pozzan (2002) zeigen, dass solche lokalen Erhöhungen der cAMP-Konzentration spezifisch die dort befindliche PKA im Bereich des T-Tubulus aktiviert. Folglich sind also die Konsequenzen einer PKA-Aktivierung abhängig von dem Ort dieser Aktivierung und sind so in diesen lokalen Membran-gebundenen Domänen vollständig unterschiedlich zu einem eher generellen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration, wie sie z.B. nach β -adrenerger Stimulation des Myokards in Folge einer Ischämie-induzierten Katecholamin-Freisetzung auftritt (Schrör und Funke, 1985; Schömig et al., 1984).

In einer früheren Veröffentlichung aus der Arbeitsgruppe, in der auch die vorliegende Arbeit entstand, wurde bereits postuliert, dass Trapidil die PKA in einer cAMP-unabhängigen Art und Weise aktiviert (Bönisch et al., 1998). Weitere pharmakologische Untersuchungen legten die Vermutung nahe, dass Trapidil möglicherweise eine Selektivität für PKAII β aufweist (Osinski und Schrör, 1999). Die von Bönisch et al. (1998) gefundenen Ergebnisse zur

Aktivierung von PKA durch Trapidil in einem Zell-freien System konnten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Diese Ergebnisse wurden mit einem käuflichen PKA-Holoenzym (#P5511, Sigma, Deisenhofen), gewonnen aus Rinder-Herz, gefunden. Aufgrund der Aufreinigungsmethode nach Gilman (1970) konnte nicht ausgeschlossen werden, dass diese PKA immer noch Spuren von freiem oder Enzym-gebundenem cAMP enthält. Folglich konnten die Ergebnisse aus diesen Versuchen als eine direkte Aktivierung interpretiert werden, könnten jedoch auch durch eine 'Sensitivierung' der PKA gegenüber den cAMP-Spuren unter Trapidil-Einwirkung erklärt werden. Diese indirekte Aktivierung könnte möglicherweise auf einem allosterischen Effekt von Trapidil auf die cAMP-Bindungsstellen der PKA beruhen. Aus diesem Grund wurden in der Folge Versuche durchgeführt mit aufgereinigten rekombinanten PKA-Holoenzymen, die absolut kein freies und kein Protein-gebundenes cAMP enthielten. Mit diesen Holoenzymen zeigte sich, dass Trapidil in Abwesenheit von zugesetztem cAMP nicht in der Lage war, die PKA zu aktivieren. Eine Aktivierung zeigte sich jedoch nach Zugabe physiologischer Konzentrationen von cAMP und eine Steigerung dieser Aktivität bei Kombination von cAMP und Trapidil. Dies spricht eher für einen indirekten Effekt von Trapidil, bei dem die Substanz die Wirkung von cAMP verstärkt. Weiterhin zeigten die Versuche eine eindeutige Isoform-Selektivität dieses Effektes. Ausschließlich die beiden Holoenzyme, die mit RII α bzw. RII β gebildet wurden, zeigten diesen Effekt. Kein solcher Effekt war bei dem Holoenzym, welches mit RI α geformt wurde, zu beobachten. Folglich kann geschlossen werden, dass Trapidil selektiv nur eine lokale Aktivierung der PKA vermittelt, die auf die subzellulären Bereiche beschränkt ist, in denen die PKAII zu finden ist.

Zusammenfassend lässt sich aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse sagen, dass Trapidil ein effektives kardioprotektives Pharmakon bei I/R darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass sich diese Eigenschaft auch in dem neu etablierte Langendorff-Modell für Mäuse zeigt. Die Substanz erhöht selektiv die Aktivität von PKAII-Isoformen in Anwesenheit von cAMP, was möglicherweise auf einen allosterischen Effekt auf die cAMP-Bindungsstellen zurückzuführen ist. Diese Eigenschaft unterscheidet Trapidil deutlich von Katecholaminen, welche zu einer eher unselektiven Aktivierung der PKA durch die Erhöhung des zytosolischen cAMP-Gehaltes führen. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die PLB-Phosphorylierung durch die Trapidil-vermittelte PKA-Aktivierung moduliert wird. Diese Erhöhung der PLB-Phosphorylierung trägt möglicherweise über eine erhöhte Ca²⁺-Aufnahme in das SR zur kardioprotektiven Wirkung der Substanz bei. Weiterhin konnte

eine Modulation der Expression einer katalytischen PKA-Untereinheit gezeigt werden, die möglicherweise zu dem I/R-spezifischen Effekt von Trepidil beiträgt. Die gefundenen Ergebnisse könnten auch die protektiven Effekte von Trepidil bei myokardialer Ischämie *in vivo* erklären (Yasue et al., 1999; Raubach et al., 1997).

5. Literaturverzeichnis

- Ambrosio G, Tritto I. Clinical manifestations of myocardial stunning. *Coron Artery Dis.* 2001;12:357-361.
- Armiger LC, Seelye RN, Phil D, Elswijk JG, Carnell VM, Benson DC, Gavin JB, Herdson PB. Mitochondrial changes in dog myocardium induced by lactate in vivo. *Lab Invest.* 1975;33:502-508.
- Autry JM, Jones LR. Functional co-expression of the canine cardiac Ca²⁺ pump and phospholamban in *Spodoptera frugiperda* (Sf21) cells reveals new insights on ATPase regulation. *J Biol Chem.* 1997;272:15872-15880.
- Beebe SJ, Corbin JD. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *The Enzymes.* 1986;17:43-111.
- Beebe SJ, Holloway R, Rannels SR, Corbin JD. Two classes of cAMP analogs which are selective for the two different cAMP-binding sites of type II protein kinase demonstrate synergism when added together to intact adipocytes. *J Biol Chem.* 1984;259:3539-3547.
- 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/Drug Res.* 1991;41:461-468.
- Block HU, Heinroth I, Giessler C, Pönicke K, Mentz P, Zehl U, Rettkowski W, Dunemann A, Förster W. Zur Beeinflussung der Biosynthese und Wirkung von Thromboxan A₂ und Prostazyklin durch Trapidil (Rocornal®). *Biomed Biochim Acta.* 1983;42:283-299.
- Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, DuBose CM, Lai EK, Roberts R, McCay PB. Direct evidence that oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:4695-4699.
- Bolli R, Cannon RO, Speir E, Goldstein RE, Epstein SE. Role of cellular proteinases in acute myocardial infarction. I. Proteolysis in non-ischemic and ischemic rat myocardium and the effects of antipain, leupeptin, pepstatin and chymostatin administered in vivo. *J Am Coll Cardiol.* 1983;2:671-680.

- Bönisch D, Weber A-A, 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.
- Boynton AL, Whitfield JF. The role of cAMP in cell proliferation: A critical assessment of the evidence. *Adv Cyclic Nucleotide Res.* 1983;15:193-294.
- Burton KA, Johnson BD, Hausken ZE, Westenbroek RE, Idzerda RL, Scheuer T, Scott JD, Catterall WA, McKnight GS. Type II regulatory subunits are not required for the anchoring-dependent modulation of Ca²⁺ channel activity by cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:11067-11072.
- Cadd G, McKnight GS. Distinct patterns of cAMP-dependent protein kinase gene expression in mouse brain. *Neuron.* 1989;3:71-79.
- Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol.* 2000;190:255-266.
- Carr DW, Hausken ZE, Fraser ID, Stofko-Hahn RE, Scott JD. Association of the type II cAMP-dependent protein kinase with a human thyroid RII-anchoring protein: cloning and characterization of the RII-binding domain. *J Biol Chem.* 1992;267:13376-13382.
- Carr DW, Scott JD. Blotting and band-shifting: techniques for studying protein-protein interactions. *Trends Biochem Sci.* 1992;17:246-249.
- 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.
- Case RB. Ion alterations during myocardial ischemia. *Cardiology.* 1971;56:245-262.
- Cercek B, Ebrahimi R, Dimayuga P, Khorsandi M, Forrester JS. Trepidil prevents rat vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo. *JACC.* 1991;17:72A.
- Chien KR, Reeves JP, Buja LM, Bonte F, Parkey RW, Willerson JT. Phospholipid alterations in canine ischemic myocardium. Temporal and topographical correlations with Tc-99m-PPI accumulation and an in vitro sarcolemmal calcium permeability defect. *Circ Res.* 1981;48:711-719.

- Cobbe SM, Poole-Wilson PA. The time of onset and severity of acidosis in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* 1980;12:745-760.
- Colledge M, Dean RA, Scott GK, Langeberg LK, Huganir RL, Scott JD. Targeting of PKA to glutamate receptors through a MAGUK-AKAP complex. *Neuron.* 2000;27:107-119.
- Colledge M, Scott D. AKAPs: from structure to function. *Trends Cell Biol.* 1999;19:216-221.
- Colyer J. Phosphorylation states of phospholamban. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;853:79-91.
- Corbin JD, Sugden PH, West L, Flockhardt DA, Lincoln TM, McCarthy D. Studies on the properties and mode of action of purified regulatory subunit of bovine heart adenosine 3':5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 1978;253:3997-4003.
- Cornea RL, Jones LR, Autry JM, Thomas DD. Mutation and phosphorylation change the oligomeric structure of phospholamban in lipid bilayers. *Biochemistry.* 1997;36:2960-2967.
- Corr PB, Sobel BE. The importance of metabolites in the genesis of ventricular dysrhythmia induced by ischemia. I. Electrophysiological considerations. *Mod Concepts Cardiovasc Dis.* 1979;28:43-48.
- Covell JW, Pool PE, Braunwald E. Effects of acutely induced ischemic heart failure on myocardial high energy phosphate stores. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1967;124:126-131.
- Cummings DE, Brandon EP, Planas JV, Motamed K, Idzerda RL, McKnight GS. Genetically lean mice result from targeted disruption of the RII β subunit of protein kinase A. *Nature.* 1996;382:622-626.
- Døskeland SO. Evidence that rabbit muscle protein kinase has two kinetically distinct binding sites for adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. *Biochem Biophys Res Commun.* 1978;83:542-549.
- Downing SE. Wall tension and myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion. *Am J Physiol.* 1993;264:H386-H393.

- 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.
- Engels W, Van Bilsen M, De Groot MJM, Lemmens PJMR, Willemsen PHM, Reneman RS, Van Der Vusse GJ. Ischemia and reperfusion induced formation of eicosanoids in isolated rat hearts. *Am J Physiol.* 1990;258:H1865-H1871.
- Farber JL, Chien KR, Mittnacht S. The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am J Pathol.* 1981;102:271-281.
- Fimia GM, Sassone-Corsi P. Cyclic AMP signaling. *J Cell Sci.* 2001;114:1971-1972.
- 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.
- Fujii J, Ueno A, Kitano K, Tanaka S, Kadoma M, Tada M. Complete complementary DNA-derived amino acid sequence of canine cardiac phospholamban. *J Clin Invest.* 1987;79:301-304.
- Fujii J, Kadoma M, Tada M, Tada H, Sakiyama F. Characterization of structural unit of phospholamban by amino acid sequencing and electrophoretic analysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986;138:1044-1050.
- Füller H, Hauschild F, Modersohn D, Thomas E. Pharmakologie des 5-Methyl-7-diethylamins-triazolo (1,5- α) pyrimidin (Trapymin, Rocornal), einer Verbindung mit koronargefäÙerweiternder Wirkung. *Pharmazie.* 1971;26:554-562.
- Giessler C, Fahr A, Tertov VV, Kudryashov SA, Orekhov AN, Smirnov VN, Mest HJ. Trapidil derivatives as potential antiatherosclerotic drugs. *Arzneimittelforschung/Drug Res.* 1987;37:538-541.

- Gilman AG. A protein binding assay for adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1970;67:305-312.
- Goto K, Ishige A, Sekiguchi K, Iizuka S, Sugimoto A, Yuzurihara M, Aburada M, Hosoya E, Kogure K. Effects of cycloheximide on delayed neuronal death in rat hippocampus. *Brain Res*. 1990;534:299-302.
- Granger DN. Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation*. 1999;6:167-178.
- Gross GJ, Kersten JR, Warltier DC. Mechanisms of postischemic contractile dysfunction. *Ann Thorac Surg*. 1999;68:1898-1904.
- Harder S, Thürmann 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.
- Hearse, DJ. Myocardial protection during ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem*. 1998;186:177-184.
- Hirche H, Franz C, Bos L, Bissig R, Lang R, Schramm M. Myocardial extracellular K^+ and H^+ 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.
- Hirsch AH, Glantz SB, Li Y, You Y, Rubin CS. Cloning and expression of an intron-less gene for AKAP 75, an anchor protein for the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase II beta. *J Biol Chem*. 1992;267:2131-2134.
- Hohlfeld T. Trepidil in experimental myocardial ischemia. *Fundam Clin Pharmacol*. 1999;13(Suppl.1):S28-2.
- James P, Inui M, Tada M, Chiesi M, Carafoli E. Nature and site of phospholamban regulation of the Ca^{2+} pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature*. 1989;342:90-92.
- Janse MJ, Kleber A. Electrophysiological changes and ventricular arrhythmias in the early phase of regional myocardial ischemia. *Circ Res*. 1981;49:1069-1081.
- Jennings RB, Murry CE, Steenbergen C jr, Reimer KA. Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation*. 1990;82(Suppl.II):II2-II12.

- Jennings RB, Reimer KA, Steenbergen C. Effect of inhibition of the mitochondrial ATPase on net myocardial ATP in total ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* 1991;23:1383-1395.
- Jennings RB, Hawkins HK, Lowe JE, Hill ML, Klotman S, Reimer KA. Relation between high-energy phosphate and lethal injury in myocardial ischemia in the dog. *Am J Pathol.* 1978;92:187-214.
- Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HH, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol.* 1960;70:68-78.
- Jennings RV, Sommers HM, Kaltenbach JP, West JJ. Electrolyte alterations in acute myocardial ischemic injury. *Circ Res.* 1964;14:260-269.
- Jones LR, Simmerman HKB, Wilson WW, Gurd FRN, Wegener AD. Purification and characterization of phospholamban from canine cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 1985;260:7721-7730.
- Kato H, Kanellopoulos GK, Matsuo S, Wu YJ, Jacquin MF, Hsu CY, Choi DW, Kouchoukos NT. Protection of rat spinal cord from ischemia with dextrorphan and cycloheximide: effects on necrosis and apoptosis. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1997;114:609-618.
- Kimura Y, Kurzydowski K, Tada M, MacLennan DH. Phospholamban inhibitory function is activated by depolymerization. *J Biol Chem.* 1997;272:15061-15064.
- Kleber AG. Resting membrane potential, extracellular potassium activity, and intracellular sodium activity during acute global ischemia in isolated guinea pig hearts. *Circ Res.* 1983;52:442-450.
- Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part I. *Circulation.* 2001(A);104:2981-2989.
- Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part II. *Circulation.* 2001(B);104:3158-3167.
- Kloner RA, Arimie RB, Kay GL, Cannom D, Matthews R, Bhandari A, Shook T, Pollick C, Burstein S. Evidence for stunned myocardium in humans: a 2001 update. *Coron Artery Dis.* 2001;12:349-356.

- Klug GA, Knudson MB, Cartier LJ, Gollnick PD. Cardiac contractility, cAMP-dependent protein kinase, and phosphorylase activation during acute pressure overload. *Pflüger's Arch.* 1984;402:216-221.
- Kodama I, Wilde A, Janse MJ, Durrer D, Yamada K. Combined effects of hypoxia, hyperkalemia and acidosis on membrane action potential and excitability of guinea pig ventricular muscle. *J Mol Cell Cardiol.* 1984;16:247-259.
- Krebs EG, Beavo JA. Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu Rev Biochem.* 1979;48:923-959.
- Kranias EG, Schwartz A, Jungmann RA. Characterization of 3':5'-AMP-dependent protein kinase in sarcoplasmic reticulum and cytosol of canine myocardium. *Biochim Biophys Acta.* 1982;709:28-37.
- Kübler W, Spieckermann PG. Regulation of glycolysis in the ischemic and the anoxic myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 1970;1:351-377.
- Kurz T, Offner B, Schrieck J, Richardt G, Tölg R, Schömig A. Nonexocytotic noradrenaline release and ventricular fibrillation in ischemic rat hearts. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1995;352:491-496.
- Lange R, Kloner RA, Zierler M, Carlson N, Seiler M, Khuri SF. Time course of ischemic alterations during normothermic and hypothermic arrest and its reflection by on-line monitoring of tissue pH. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1983;86:418-434.
- Latta G. Wirkung von Kalzium-Antagonisten auf Thrombozytenfunktion und Thromboxanbildung bei gesunden Probanden *in vitro* und *ex vivo*. 1986; Dissertation, Universität zu Köln.
- Li M, West JW, Numann R, Murphy BJ, Scheuer T, Catterall WA. Convergent regulation of sodium channels by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *Science.* 1993;261:1439-1442.
- Liu AY-C. Differentiation-specific increase of cAMP-dependent protein kinase in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem.* 1982;257:298-306.
- 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, Doetschmann 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.
- Luo Z, Shafit-Zagardo B, Erlichman J. Identification of the MAP2- and P75-binding domain in the regulatory subunit (RII beta) of type II cAMP-dependent protein kinase: cloning and expression of the cDNA for bovine brain RII beta. *J Biol Chem.* 1990;265:21804-21810.
- Maresta A, Balducelli M, Cantini L, Casari A, Chion R, Fabbi M, Fontanelli A, Monici-Preti PA, Repetto S, DeServi S, Varani E. Trapidil (triazolopyrimidine), a platelet-derived growth factor antagonist, reduces restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. Results of the randomized, double-blind STARC study. *Circulation.* 1994;90:2710-2715.
- Maronde E. Cyclische Nukleotide als Regulatoren von Zellwachstum und Zelldifferenzierung. 1993; Dissertation, Universität Bremen.
- Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Roseblit N, Marks AR. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell.* 2000;101:365-376.
- Mazurov AV, Menshikov MY, Leytin VL, Tkachuk VA, Repin VS. Decrease of platelet aggregation and spreading via inhibition of the cAMP phosphodiesterase by trapidil. *FEBS Lett.* 1984;172:167-171.
- McCartney S, Little BM, Langeberg LK, Scott JD. Cloning and characterization of A-kinase anchor protein 100 (AKAP100): a protein that targets A-kinase to the sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 1995;270:9327-9333.
- McCord JM, Roy RS, Schaffer SW. Free radicals and myocardial ischemia. The role of xanthine oxidase. *Adv Myocardiol.* 1985;5:183-189.
- Meinkoth JL, Ji Y, Taylor SS, Feramisco JR. Dynamics of the distribution of cyclic AMP-dependent protein kinase in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:9595-9599.

- Merante F, Mickle DA, Weisel RD, Li RK, Tumiati LC, Rao V, Williams WG, Robinson BH. Myocardial aerobic metabolism is impaired in a cell culture model of cyanotic heart disease. *Am J Physiol.* 1998;275:H1673-H1681.
- Mochizuki S, Neely JR. Control of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol.* 1979;11:221-236.
- Mortishire-Smith RJ, Pitzenberger SM, Burke CJ, Middaugh CR, Garsky VM, Johnson RG. Solution structure of the cytoplasmic domain of phospholamban: phosphorylation leads to a local perturbation in secondary structure. *Biochemistry.* 1995;34:7603-7613.
- Most AS, Capone RJ, Mastrofranceso PA. Free fatty acids and arrhythmias following acute coronary artery occlusion in pigs. *Cardiovasc Res.* 1977;11:198-205.
- Nayler WG. The heart cell: Some metabolic aspects of cardiac arrhythmias. *Acta Med Scand.* 1981 (A);647:17-31.
- Nayler WG. The role of calcium in the ischemic myocardium. *Am J Pathol.* 1981 (B);102:262-270.
- Neely JR, Feuvray D. Metabolic products and myocardial ischemia. *Am J Pathol.* 1981;102:282-291.
- Netticadan T, Temsah R, Osada M, Dhalla NS. Status of Ca²⁺/calmodulin protein kinase phosphorylation of cardiac SR proteins in ischemia-reperfusion. *Am J Physiol.* 1999;277:C384-C391.
- Obar RA, Dingus J, Bayley H, Vallee RB. The RII subunit of the cAMP-dependent protein kinase binds to a common amino-terminal domain in microtubule-associated proteins 2A, 2B and 2C. *Neuron.* 1989;3:639-645.
- Ohnishi H, Yamaguchi K, Shimada S, Suzuki Y, Kumagi A. A new approach to treatment of atherosclerosis and trapidil as an antagonist to platelet-derived growth factor. *Life Sci.* 1982;31:2595-2602.
- Osada M, Netticadan T, Tamura K, Dhalla NS. Modification of ischemia-reperfusion-induced changes in cardiac sarcoplasmic reticulum by preconditioning. *Am J Physiol.* 1998;274:H2025-H2034.

- Osinski MT, Schrör K. Trapidil mediates its antimitogenic effect by direct activation of protein kinase A II. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1999;359(Suppl.3):R63.
- Przyklenk K, Simkhovich BZ, Bauer B, Hata K, Zhao L, Elliott GT, Kloner RA. Cellular mechanisms of infarct size reduction with ischemic preconditioning. Role of calcium? *Ann N Y Acad Sci.* 1999;874:192-210.
- Rao V, Ivanov J, Weisel RD, Cohen G, Borger MA, Mickle DA. Lactate release during reperfusion predicts low cardiac output syndrome after coronary bypass surgery. *Ann Thorac Surg.* 2001;71:1925-1930.
- 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.
- Richardt G, Waas W, Kranzhöfer R, Mayer E, Schömig A. Adenosine inhibits exocytotic release of endogenous noradrenaline in rat heart. A protective mechanism in early myocardial ischemia. *Circ Res.* 1987;61:117-123.
- Roesler WJ, Vandenbark GR, Hanson RW. Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription. *J Biol Chem.* 1988;263:9063-9066.
- Rouslin W, Erickson JL, Solaro RJ. Effects of oligomycin and acidosis on rates of ATP depletion in ischemic heart muscle. *Am J Physiol.* 1986;250:H503-H508.
- Rubino HM, Dammerman M, Shafit-Zagardo B, Erlichman J. Localization and characterization of the binding site for the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase on MAP2. *Neuron.* 1989;3:631-638.
- Sasaki T, Inui M, Kimura Y, Kuzuya T, Tada M. Molecular mechanism of regulation of Ca²⁺ pump ATPase by phospholamban in cardiac sarcoplasmic reticulum – Effects of synthetic phospholamban peptides on Ca²⁺ pump ATPase. *J Biol Chem.* 1992;267:1674-1679.
- Schömig A, Richardt G. Cardiac sympathetic activity in myocardial ischemia: release and effects of noradrenaline. *Basic Res Cardiol.* 1990;85(Suppl.1):9-30.

- Schömig A, Dart AM, Dietz R, Mayer E, Kübler W. Release of endogenous catecholamines in the ischemic myocardium of the rat. Part A: Locally mediated release. *Circ Res.* 1984;55:689-701.
- 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, Zwaka P, Tannhäuser R. Cardioprotective actions of trapidil in myocardial ischemia involve inhibition of the activation of NFκB. *FASEB J.* 1998;12:Suppl.A-33.
- Schrör K, Funke K. Prostaglandins and myocardial noradrenaline overflow after sympathetic nerve stimulation during ischemia and reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1985;7(Suppl.5):S50-S54.
- Schrör K, Moncada S, Ubatuba FB, Vane JR. Formation of prostacyclin (PGX) causes decrease in the coronary vascular resistance during application of arachidonic acid in the rabbit isolated heart. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1977;297(Suppl.II):R31.
- Schwartz DA, Rubin CS. Regulation of cAMP-dependent protein kinase subunit levels in Friend erythroleukemic cells. *J Biol Chem.* 1983;258:777-784.
- Scott JD, McCartney S. Localization of A-kinase through anchoring proteins. *Mol Endocrinol.* 1994;8:5-11.
- Scott JD, Stofko RE, McDonald JR, Comer JD, Vitalis EA, Mangili JA. Type II regulatory subunit dimerization determines the subcellular localization of the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 1990;265:21561-21566.
- Seyfarth M, Feng Y, Hagl S, Sebening F, Richardt G, Schömig A. Effect of myocardial ischemia on stimulation-evoked noradrenaline release. Modulated neurotransmission in rat, guinea pig, and human cardiac tissue. *Circ Res.* 1993;73:496-502.

- Simmerman HK, Collins JH, Theibert JL, Wegener AD, Jones LR. Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. *J Biol Chem.* 1986;261:13333-13341.
- Skålhegg BS, Tasken K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci.* 2000;5:678-693.
- Steenbergen C, Delleuw G, Rich T, Williamson JR. Effects of acidosis and ischemia on contractility and intracellular pH of rat heart. *Circ Res.* 1977;41:849-858.
- Sumeray MS, Yellon DM. Characterisation and validation of murine model of global ischaemia-reperfusion injury. *Mol Cell Biochem.* 1998;186:61-68.
- Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem.* 1990;59:971-1005.
- Taylor SS. cAMP-dependent protein kinase: a model for an enzyme family. *J Biol Chem.* 1989;264:8443-8446.
- Temsah RM, Netticadan T, Chapman D, Takeda S, Mochizuki S, Dhalla NS. Alterations in sarcoplasmic function and gene expression in ischemic-reperfused rat heart. *Am J Physiol.* 1999;277:H584-H594.
- Tennant R, Wiggers CJ. The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *Am J Physiol.* 1935;112:351-361.
- Tenor E, Ludwig R. Arzneimittelchemische Untersuchungen in der Reihe der s-Triazol[1.5- α]pyrimidine. *Pharmazie.* 1971;26:534-539.

- Tiell ML, Sussmann II, Gordon PB, Sanders RN. Suppression of fibroblast proliferation in vitro and of neointimal hyperplasia in vivo by the triazolopyrimidine trapidil. *Artery*. 1983;12:33-50.
- Tolnai S, Korecky B. Calcium-dependent proteolysis and its inhibition in the ischemic rat myocardium. *Can J Cardiol*. 1986;2:42-47.
- Tsokos J, Bloom S. Effects of calcium on respiration and ATP content of isolated leaky heart muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*. 1977;9:823-836.
- Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG. An adenosine 3'-5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1968;243:2867-2873.
- Wegener AD, Simmerman HKB, Lindemann JP, Jones LR. Proteolytic cleavage of phospholamban purified from canine cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles: generation of a low resolution model of phospholamban structure. *J Biol Chem*. 1986;261:5154-5159.
- Wegener AD, Jones LR. Phosphorylation-induced mobility shift in phospholamban in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels: evidence for a protein structure consisting of multiple identical phosphorylatable subunits. *J Biol Chem*. 1984;259:1834-1841.
- Williamson JR. Glycolytic control mechanisms. II: Kinetics of intermediate changes during aerobic-anoxic transition in perfused rat heart. *J Biol Chem*. 1966;241:5026-5036.
- Woditsch I. Pharmakologische und pathophysiologische Aspekte von Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin bei experimenteller Myokardischämie. 1993; Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Wollenberger A, Krause E. Metabolic control characteristics of the acutely ischemic myocardium. *Am J Cardiol*. 1969;22:349-359.
- Yang J, Drazba JA, Ferguson DG, Bond M. A-kinase anchoring protein 100 (AKAP100) is localized in multiple subcellular compartments in the adult rat heart. *J Cell Biol*. 1998;142:511-522.
- 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.

Yellon DM, Baxter GF. Protecting the ischaemic and reperfused myocardium in acute myocardial infarction: distant dream or near reality? *Heart.* 2000;83:381-387.

Zaccolo M, Pozzan T. Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science.* 2002;295:1711-1715.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das kardioprotektive Potential von Trapidil an zwei unterschiedlichen Modellen der myokardialen experimentellen Ischämie/Reperfusion untersucht. Als Modelle wurden dabei isolierte Herzen von Kaninchen bzw. Mäusen nach Langendorff verwendet. Trapidil führte in einer Konzentration von 10 μM , was im Bereich der Plasma-Konzentration nach oraler Gabe therapeutischer Dosen liegt, in beiden Modellen zu einer weitgehenden Verbesserung kardialer Funktionsparameter sowie einer massiven Verminderung der Kreatinkinase-Freisetzung während Ischämie/Reperfusion.

An diesem Modell der Myokardischämie des Kaninchens konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Ischämie/Reperfusion-induzierte Verminderung der Proteinkinase A-vermittelten Phospholamban-Phosphorylierung an Serin 16 durch Applikation von 10 μM Trapidil nahezu aufgehoben werden kann. Dies könnte in der Folge eine erhöhte Aufnahme von Ca^{2+} in das sarkoplasmatische Retikulum bewirken und somit eine Verminderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach sich ziehen. Wichtige Indizien hierfür waren der beobachtete verminderte enddiastolische Druck der Herzen sowie die verminderte Kreatinkinase-Freisetzung. Am Kaninchen-Herzen konnte weiterhin gezeigt werden, dass der Einsatz von Trapidil ausschließlich während der Reperfusion nicht ausreichend ist, um einen deutlichen kardioprotektiven Effekt zu erzielen. Ebenso konnte mittels des Proteinsynthese-Hemmstoffs Cycloheximid keine Beteiligung einer Proteinneusynthese an der kardioprotektiven Wirkung von Trapidil nachgewiesen werden.

In dem im Rahmen dieser Arbeit aufgebauten Mäuse-Modell der Myokardischämie konnte die kardioprotektive Wirkung von Trapidil bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die regulatorische Proteinkinase A-Untereinheit $\text{RII}\alpha$, welche als einzige regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A im Mäuseherzen exprimiert wird, durch Ischämie/Reperfusion vermehrt in den Herzen exprimiert wurde, jedoch kein Einfluss von Trapidil auf diesen Effekt zu beobachten war. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Ischämie/Reperfusion-induzierte Verminderung der Expression der katalytischen Proteinkinase A-Untereinheit $\text{C}\gamma$ durch eine Behandlung mit Trapidil aufgehoben wird. Dies könnte bedeuten, dass unter Ischämie/Reperfusion vermehrt das Proteinkinase A-Holoenzym der Isoform $\text{II}\alpha$ zur Verfügung steht.

Im letzten Teil dieser Arbeit konnte in einem Zell-freien Proteinkinase A-Aktivitäts-Assay gezeigt werden, dass Trapidil nicht in der Lage ist, die cAMP-freien Proteinkinase A-Holoenzyme der Isoformen I α , II α und II β direkt zu aktivieren. Hingegen konnte Trapidil die Aktivierung der Proteinkinase AII-Isoformen in Anwesenheit physiologischer Konzentrationen von cAMP signifikant über den reinen cAMP-Effekt hinaus steigern. Dies konnte jedoch für die Isoform I α nicht gezeigt werden. Die Ergebnisse sprechen für einen indirekten Effekt von Trapidil, bei dem die Substanz die Wirkung von cAMP verstärkt, und zeigen eine eindeutige Isoform-Selektivität.

Es wird geschlossen, dass Trapidil ein effektives kardioprotektives Pharmakon bei Ischämie/Reperfusion darstellt. Die Substanz erhöhte selektiv die Aktivität von Proteinkinase AII-Isoformen in Anwesenheit von cAMP, was möglicherweise auf einen allosterischen Effekt auf die cAMP-Bindungsstellen an den regulatorischen Untereinheiten RII α und RII β zurückzuführen ist. Diese Eigenschaft unterscheidet Trapidil deutlich von Katecholaminen, welche zu einer eher unselektiven Aktivierung der PKA durch die Erhöhung des zytosolischen cAMP-Gehaltes führen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Ischämie/Reperfusion-induzierte Verminderung der Phospholamban-Phosphorylierung durch die Trapidil-vermittelte Proteinkinase A-Aktivierung nahezu aufgehoben wurde. Diese Modulation der Phospholamban-Phosphorylierung trug möglicherweise über eine erhöhte Ca²⁺-Aufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum zur kardioprotektiven Wirkung der Substanz bei. Weiterhin konnte eine Modulation der Expression einer katalytischen PKA-Untereinheit gezeigt werden, die möglicherweise zu dem Ischämie/Reperfusion-spezifischen Effekt von Trapidil beitrug. Die gefundenen Ergebnisse könnten auch die protektiven Effekte von Trapidil bei myokardialer Ischämie *in vivo* erklären.

Appendix A: Lebenslauf

Oliver J. Sichelschmidt

Geboren am 19.04.1973 in Schwelm

- 1979 - 1983 Grundschule in Ennepetal
- 1983 - 1992 Märkisches Gymnasium Schwelm, Abschluß: Abitur
- 04/1993 – 06/1994 Zivildienst (Kontakt- und Krisenhilfe e.V., Schwelm)

Studium

- 10/1994 – 03/1999 Biologie-Studium an der Ruhr-Universität Bochum; Diplomarbeit in der AG Biochemische Pharmakologie des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Ruhr-Universität Bochum zum Thema 'Enterale Sekretion cardiotoner Steroide an der Mucosa des Meerschweinchenjunums und -colons unter besonderer Berücksichtigung der Rolle des P-Glykoproteins'
- 10/1998 Gewährung eines Studienabschluss-Stipendiums der Ruth und Gert Massenberg-Stiftung
- 03/1999 Abschluß des Studiums (Diplom)

Promotion

- 04/1999 – 11/2002 Promotion am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Appendix B: Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die vorliegende Doktorschrift selbständig 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

Appendix C: Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karsten Schrör für die Überlassung des Themas sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes an dem von ihm geleiteten Institut. Seine kompetente Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft prägten diese Arbeit wesentlich.

Herrn Prof. Dr. Manfred Grieshaber danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. Thomas Hohlfeld danke ich für seine Diskussionsbereitschaft und seine hilfreichen Anregungen.

Herrn Dr. Artur-Aron Weber möchte ich besonders danken für die freundliche Unterstützung sowie sehr wertvolle Anregungen und Diskussionen.

Frau Erika Lohmann und Frau Karin Montag möchte ich für die ständige und freundliche Unterstützung bei der Bewältigung organisatorischer und aller sonstigen Probleme danken.

Frau Ulrike Drostent möchte ich danken für die technische Assistenz und für weitere Unterstützung.

Herrn Grad.-Ing. Hans-Jürgen Springer möchte ich trotz seines Wunsches, hier nicht genannt zu werden, für seine immer freundliche, kreative und ständige Unterstützung bei allen technischen Fragen danken.

Herrn PD Dr. Friedrich W. Herberg (Bochum) und seinen Mitarbeitern danke ich für die Bereitstellung der rekombinanten PKA-Untereinheiten und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Frau Ilse Alonso danke ich für die technische Assistenz.

Allen meinen Kollegen danke ich für die stete Hilfsbereitschaft, anregende Diskussionen und die angenehme Atmosphäre am Institut.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, die mich auf alle erdenklichen Arten und Weisen unterstützt haben.

Diese Arbeit wurde finanziell Unterstützt durch die DFG (SFB 612, Teilprojekt A6) und die Forschungsgruppe Herz-Kreislauf e.V. (Düsseldorf). Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Trapidil wurde freundlicherweise von UCB (Kerpen) zur Verfügung gestellt.

Appendix D: Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit

- 1.) Sichelschmidt OJ, Hohlfeld T, Schrör K. Trapidil treatment improves phosphorylation of phospholamban at Ser16 in isolated reperfused ischemic rabbit hearts. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2001;363(Suppl.4):R104.
- 2.) Sichelschmidt OJ, Hahnefeld C, Hohlfeld T, Herberg FW, Schrör K. A triazolopyrimidine reduces myocardial ischemic reperfusion injury by stimulating PKAII-dependent phosphorylation of phospholamban. *Circulation.* 2002 (im Druck).
- 3.) Sichelschmidt OJ, Hahnefeld C, Hohlfeld T, Herberg FW, Schrör K. Trapidil protects ischemic hearts from reperfusion injury by stimulating PKAII activity. *Cardiovasc Res.* (Manuskript eingereicht).
- 4.) Sichelschmidt OJ, Hohlfeld T, Schrör K. Cardioprotective effects of trapidil in a experimental mouse ischemia/reperfusion model - role of protein kinase A-dependent phosphorylation of phospholamban. (Manuskript in Vorbereitung).