

Aus dem
Zentrum für Physiologie
Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen Schrader

Die Umsatzrate der AMP-Desaminase im Meerschweinchenherzen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Se-Chan Kim

2003

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-HeineUniversität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H. M. Raab, Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Ulrich K. M. Decking

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Martin Schwenen

Meiner Familie
In Gedenken an Volker

Abkürzungen

ADA	Adenosin-Desaminase
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPD	AMP-Desaminase
AOPCP	alpha,beta-Methylen-Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches 3', 5'-Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CoA	Coenzym A
EHNA	Erythro-9-(2-Hydroxy-3-nonyl)adenin
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IDP	Inosindiphosphat
IMP	Inosinmonophosphat
ITP	Inosintriphosphat
kDa	Kilo-Dalton
KHB	Krebs-Henseleit-Puffer
Ki	Dissoziationskonstante für einen Enzym-Inhibitor-Komplex
K _M	Michaelis-Konstante
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NO	Nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
Pi	anorganisches Phosphat
PRPP	5-Phospho-ribosyl-1-diphosphat
SAH	S-Adenosyl-L-Homocystein
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit
XOD	Xanthin-Oxidase

Inhalt

1	Einleitung.....	7
1.1	Allgemeines.....	7
1.2	Kardialer Adenosin- und Adenin-Nukleotid-Stoffwechsel.....	8
1.3	Enzyme im Adenosin- und Adenin-Nukleotid-Stoffwechsel.....	10
1.3.1	AMP-Desaminase (EC 3.5.4.6).....	11
1.3.1.1	Enzymkinetik.....	12
1.3.1.2	Effektoren der AMP-Desaminase.....	12
1.3.1.3	Regulation der AMP-Desaminase-Aktivität.....	13
1.3.2	5'-Nukleotidase (EC 3.1.3.5).....	15
1.3.3	Adenosin-Desaminase (EC 3.5.4.4).....	15
1.3.4	Purin-Nukleosid-Phosphorylase (EC 2.4.2.1).....	16
1.3.5	Xanthin-Oxidase (EC 1.3.2.3).....	16
1.3.6	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.8).....	17
1.4	Inhibition der am Purin-Stoffwechsel beteiligten Enzyme.....	17
1.5	Fragestellung.....	18
2	Material und Methoden.....	19
2.1	Modelle.....	19
2.1.1	Isolierte Perfusion nach Langendorff.....	19
2.1.1.1	Präparation.....	19
2.1.1.2	Versuchsanlage.....	19
2.1.1.3	Generelle Versuchsdurchführung.....	21
2.1.2	Enzymaktivität im Gewebehomogenat.....	21
2.1.3	Isolierte Kardiomyozyten.....	22
2.2	Inhibitoren.....	23
2.2.1	Inhibition der Adenosin-Desaminase durch EHNA.....	23
2.2.2	Inhibition der Xanthin-Oxidase durch Allopurinol.....	23
2.2.3	Inhibition der AMP-Desaminase durch GP 3521 und GP 3449.....	24
2.2.4	Inhibition der Adenosin-Desaminase und AMP-Desaminase durch Coformycin.....	24
2.2.5	Methotrexat.....	25
2.3	Protokolle und Fragestellungen.....	25
2.3.1	Abschätzung der Umsatzrate der AMP-Desaminase unter verschiedenen Bedingungen.....	25
2.3.1.1	EHNA und Allopurinol.....	25
2.3.1.2	GP 3521.....	26
2.3.1.3	Effekte von GP 3521 unter hypoxischen Bedingungen.....	27
2.3.1.4	Purinfreisetzung unter GP 3449 und EHNA.....	28
2.3.1.5	Abschätzung der Umsatzrate der AMP-Desaminase unter Coformycin.....	29
2.3.2	Einfluss der Purin-de-novo-Synthese.....	30
2.3.3	Hemmbarkeit der AMP-Desaminase im myokardialen Gewebeextrakt.....	30
2.3.4	Myokardialer Nukleotid- und Nukleosidgehalt nach Ischämie.....	31
2.3.5	Zellpermeabilität von Kardiomyozyten.....	31
2.4	Analytische Methoden.....	32
2.4.1	Probenaufbereitung.....	32
2.4.1.1	Probenaufbereitung für die HPLC zur Bestimmung von Adenosin, Inosin, Hypoxanthin, Xanthin und Harnsäure.....	32

2.4.1.2	Gewebeextraktion.....	33
2.4.1.3	Probenaufbereitung der Kardiomyozyten.....	34
2.4.2	HPLC-Analyse.....	34
2.4.2.1	Bestimmung der Purine.....	34
2.4.2.2	Bestimmung der Nukleotide.....	35
2.4.2.3	Bestimmung von GP 3521 in isolierten Kardiomyozyten.....	36
2.5	Auswertung und Statistik.....	36
3	Ergebnisse.....	37
3.1	Inosin- und Hypoxanthin-Freisetzung in Normoxie und Hypoxie zur Bestimmung der Umsatzrate der AMP-Desaminase.....	38
3.2	Bedeutung der Purin-de-novo-Synthese.....	42
3.3	Direkte Inhibition der AMP-Desaminase zur Bestimmung der Umsatzrate.....	44
3.3.1	Effizienz der Inhibitoren.....	44
3.3.1.1	AMP-Desaminase-Kinetik unter Coformycin.....	44
3.3.1.2	Hemmung der isolierten AMP-Desaminase durch GP 3521.....	45
3.3.2	Effekte von Coformycin und GP 3521 auf die Purinfreisetzung.....	47
3.3.2.1	Purinfreisetzung in Normoxie unter Coformycin.....	47
3.3.2.2	Purinfreisetzung unter GP 3521.....	50
3.3.2.3	Purinfreisetzung in Hypoxie unter GP 3521 und EHNA.....	53
3.3.3	Wirkung von GP 3521 in globaler Ischämie.....	55
3.3.4	GP 3521 Permeabilität.....	56
3.3.5	Purinfreisetzung unter GP 3449.....	57
3.3.6	Wirkung von GP 3449 bei globaler Ischämie.....	59
4	Diskussion.....	61
4.1	Bedeutung der myokardialen AMP-Desaminase.....	61
4.2	Direkte Inhibition der AMP-Desaminase zur Bestimmung der Umsatzrate.....	66
4.3	Abschließende Betrachtung.....	69
5	Literaturverzeichnis.....	71
6	Zusammenfassung.....	85
7	Lebenslauf.....	87
8	Danksagung.....	89

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

1963 stellten Berne und Gerlach et al. unabhängig voneinander die Adenosin-Hypothese auf, die besagt, dass Adenosin die Koronardurchblutung der kardialen Stoffwechselsituation anpasst (3;26). Bei abfallender kardiomyozytärer Sauerstoffspannung - so die Hypothese - wird Adenosin freigesetzt und gelangt durch das Interstitium an die Adenosin-Rezeptoren der glatten Muskulatur der Koronargefäße, um dort eine Vasodilatation zu bewirken. Die dadurch gesteigerte Koronardurchblutung führt zu einer Wiederherstellung der normalen Sauerstoffspannung.

Es konnte in mehreren Studien der koronardilatatorische Effekt von Adenosin gezeigt werden (31;57;62). Heute wissen wir, dass eine Vasodilatation über A_2 -Rezeptoren der glatten Muskelzellen vermittelt wird. Es gibt allerdings auch Hinweise, dass der vasodilatatorische Effekt von Adenosin auch über A_2 -Rezeptoren des Endothels vermittelt wird (57). Stepp und Mitarbeiter untersuchten die Dosis-Wirkungs-Beziehung von interstitiellem Adenosin zur Koronardurchblutung und stellten fest, dass bereits eine Erhöhung der interstitiellen Adenosin-Konzentration um 62 % zu einer halbmaximalen Erhöhung der Koronardurchblutung führte. Dabei wurde kein Hinweis für eine sekundäre Aktivierung eines möglichen Vasodilatators durch endotheliale Adenosin-Rezeptoren gefunden (75). Allerdings scheint Adenosin unter physiologischen Bedingungen keine Rolle bei der koronaren Flussregulation zu spielen. So führte ein um das 4-fache gesteigerter Sauerstoffverbrauch bei Hunden unter körperlicher Belastung zwar zu einem Anstieg der interstitiellen Adenosin-Konzentration, aber nicht in den Maßen, dass eine koronarvasodilatatorische Wirkung herbeigeführt werden könnte (84). Bei belastungsinduzierter O_2 -Mangelversorgung fällt der ATP-Gehalt kaum ab und die Adenosin-Konzentration steigt stark an, während es bei Okklusion und ATP-Katabolismus rasch zu einem ATP-Abfall und erheblichen Zunahmen von Adenosin kommt. Die Adenosin-Freisetzung scheint also nicht vom myokardialen Sauerstoffumsatz abhängig zu sein (49). Auch bei Inhibition der NO-Synthese kommt es nicht zu einer kompensatorischen koronaren Vasodilatation durch Adenosin. Die unter physiologischen Bedingungen gebildeten NO-Mengen haben nur eine moderate koronarvasodilatatorische Wirkung (83).

Adenosin zeigt eine antiadrenerge Wirkung am oxygenierten Herzen (21). Dieser Effekt wird über inhibitorische A_1 -Rezeptor-Subtypen vermittelt. Dadurch wird der

Phosphorylierungsstatus regulatorischer Proteine beeinflusst (58). Neuere Studien zeigen eine verstärkende Wirkung von A_{2a} -Rezeptoren auf die von A_1 -Rezeptoren-vermittelten antiadrenergen Effekte (59). Adenosin spielt weiterhin bei der Präkonditionierung des Myokards eine Rolle. Präkonditionierung im Sinne der ischämischen Präkonditionierung bedeutet, dass eine reversible Schädigung des Myokards durch kurze ischämische Phasen zu einer Ausbildung einer Kardioprotektion bei einer späteren irreversiblen Schädigung, also einem Myokardinfarkt führt. Bei Kaninchen wird bei gleichzeitiger Infusion eines Adenosin-Antagonisten und eines α_1 -Antagonisten der präkonditionierende Effekt aufgehoben (13).

1.2 Kardialer Adenosin- und Adenin-Nukleotid-Stoffwechsel

Unter physiologischen Bedingungen stehen mitochondriale ATP-Bildung und der zytosolische ATP-Verbrauch im Gleichgewicht. Substrate werden unter Sauerstoffverbrauch oxidiert, um die notwendige Energie für die Synthese von ATP aus ADP und Pi bereitzustellen. Bei der hydrolytischen Spaltung von ATP zu ADP und anorganischem Phosphat wird dann wiederum Energie frei, die fast alle energieabhängigen zellulären Prozesse treibt. Unter physiologischen Bedingungen werden die Konzentrationen von ATP (6-8 mM), Pi (1-2 mM), ADP (40 μ M), AMP (200 nM) und Adenosin (ca. 50 nM) in etwa konstant gehalten. Übersteigt der Verbrauch das Angebot, oder kommt es bei einer plötzlichen Ischämie zu einem rapiden katabolen Abbau der energiereichen Phosphate, dann nimmt die ATP-Konzentration ab, und es kommt zu einem raschen und dramatischen Anstieg von ADP, AMP, Adenosin und weiteren Metaboliten des Purin-Stoffwechsels (15).

In Kardiomyozyten wurden für den weiteren Abbau zu den Purinen und deren Katabolite zwei Wege beschrieben: Zum einen der Abbau von AMP über die AMP-spezifische 5'-Nukleotidase (EC 3.1.3.5, cN-I) zu Adenosin (Adenosin-Weg) und zum anderen der Abbauweg über die AMP-Desaminase (EC 3.5.4.6) zu IMP und nachfolgend über die IMP-spezifische 5'-Nukleotidase (cN-II) zu Inosin (IMP-Weg) (Abb. 1.1).

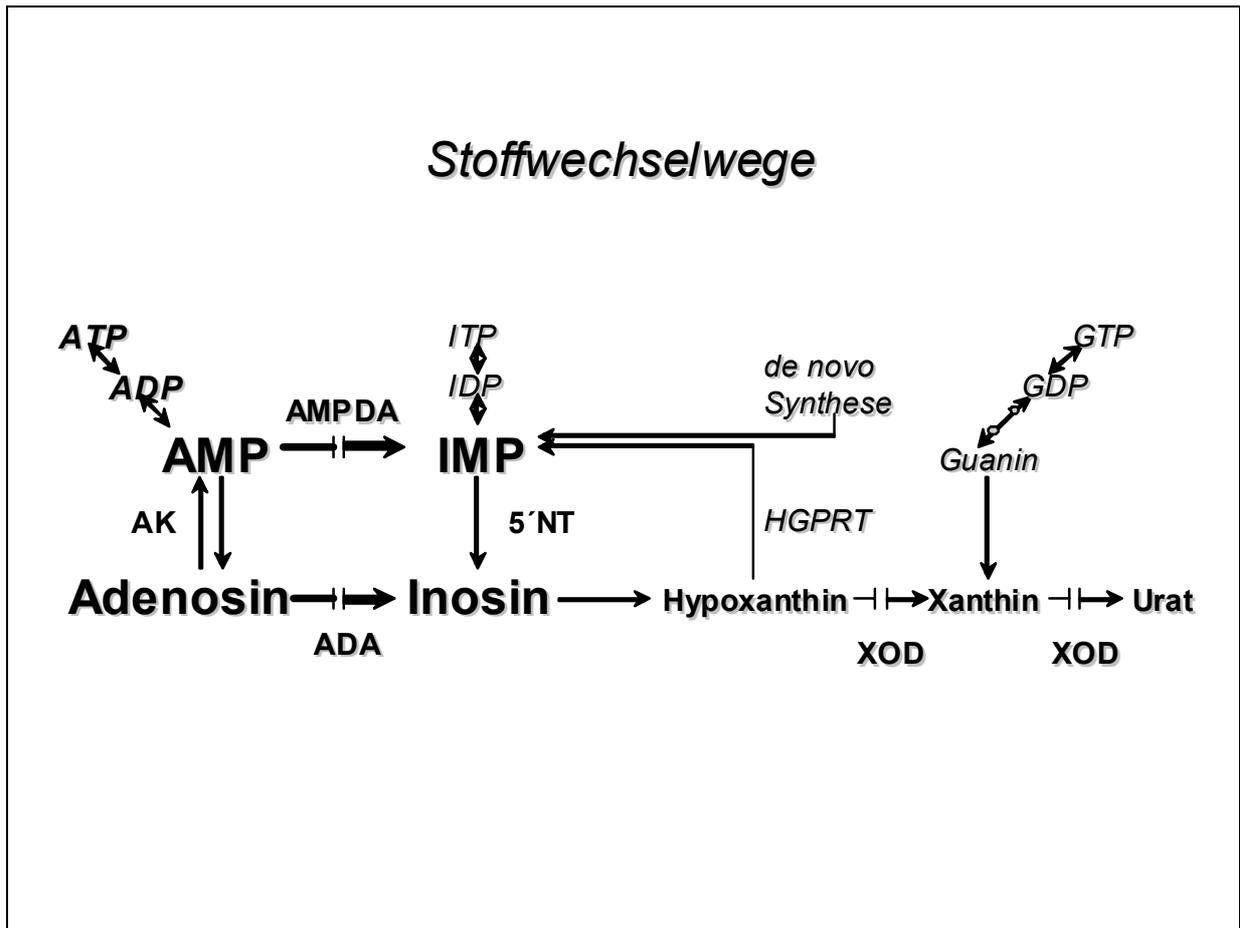


Abb. 1.1: Adenosin- und Adenin-Nukleotid-Stoffwechsel und beteiligte Enzyme. **ADA:** Adenosin-Desaminase, **AMPDA:** AMP-Desaminase, **AK:** Adenosin-Kinase, **5'NT:** 5'-Nukleotidase, **XOD:** Xanthin-Oxidase, **HGPRT:** Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase

Die Nucleoside Adenosin und Inosin werden über membranständige Transportsysteme der Kardiomyozyten in das Interstitium freigesetzt. Von dort diffundieren sie in die myokardialen Kapillaren, um dann in die koronarvenösen Gefäße abtransportiert zu werden. In den Endothelzellen werden die Nucleoside auch zu ihren Kataboliten Hypoxanthin, Xanthin und Harnsäure (Urat) abgebaut. Da die Endothelzellen auch eine hohe Adenosin-Desaminase-Aktivität aufweisen, wird auch hier ein Teil des (extrazellulär von Kardiomyozyten gebildeten) Adenosin zu Inosin abgebaut. Die Katabolite gelangen dann ebenfalls in das koronarvenöse System (71).

Unter normoxischen Bedingungen ist die AMP-Hydrolyse der Hauptstoffwechselweg für die Produktion des kardialen Adenosins. Daneben spielt die SAH-Hydrolase (47) und die zytosolische 5'-Nukleotidase (9;33) eine geringe Bedeutung bei der Bildung von Adenosin.

Mehr als 90% des kardial produzierten Adenosins werden über die Adenosin-Kinase zu AMP rephosphoryliert (sogenannter Adenosine Salvage) (47).

Die globale kardiale Adenosin-Bildungsrate beträgt z.B. im Meerschweinchenherzen etwa $2.3 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, dabei werden etwa 8% des Adenosins extrazellulär gebildet. Unter physiologischen Bedingungen wird weniger Adenosin koronarvenös freigesetzt als extrazellulär gebildet, und dementsprechend liegt ein Konzentrationsgradient in Richtung Zytosol vor. Das Endothel trägt 5% zum global gebildeten Adenosin bei. Deussen et al. postulieren, dass dennoch die vaskuläre Adenosin-Konzentration über einen großen Bereich vom Endothel reguliert wird (19;20).

Sinkt das myokardiale O_2 -Angebot, so wurde ein gleichzeitiger Anstieg der Adenosin-Freisetzung und des freien AMP beobachtet (35). Dies ist bedingt durch die eingeschränkte und unterbrochene oxidative Phosphorylierung, die bei fortbestehendem ATP-Abbau einen Anstieg der ADP- und AMP-Konzentration zwangsläufig zur Folge hat. Dabei ist die Konzentration von AMP, dem unmittelbaren Vorläufer des Adenosins, von entscheidender Bedeutung für den Umsatz sowohl der AMP-Desaminase als auch der AMP-spezifischen 5'-Nukleotidase. Bisher wurde angenommen, dass die 5'-Nukleotidase in Hypoxie aktiviert wird und es zu einer vermehrten Adenosin-Bildung kommt (29;33). Die Aktivität der 5'-Nukleotidase wird wahrscheinlich durch ADP und vor allem durch Mg^{2+} reguliert (14;53;72).

In unserem Labor konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass bei moderater Hypoxie (40% O_2) das freie AMP und die Adenosin-Bildung um das 4-fache, die koronarvenöse Adenosin-Freisetzung hingegen um das 15-20-fache anstieg. Weitere Versuche zeigten eine Hemmung der Adenosin-Kinase in Hypoxie, deren Ausmaß mit Hilfe eines mathematischen Modells abgeschätzt werden konnte. Vermehrte Adenosin-Bildung bei reduzierter Rephosphorylierung führte dann zu einer deutlich gesteigerten Adenosin-Freisetzung. Da die Metabolisierung von AMP zu Adenosin einem hohen Umsatz unterliegt, führen bereits kleine Änderungen des freien AMP rasch zu einer verstärkten Freisetzung von Adenosin (18).

1.3 Enzyme im Adenosin- und Adenin-Nukleotid-Stoffwechsel

Im Adenosin- und Adenin-Nukleotid-Stoffwechsel haben die nachfolgenden Enzyme eine Bedeutung:

AMP-Desaminase (EC 3.5.4.6): $\text{AMP} \rightarrow \text{IMP}$

AMP-spezifische 5'-Nukleotidase (EC 3.1.3.5): AMP → Adenosin

SAH-Hydrolase (EC 3.3.1.1): S-Adenosyl-L-Homocystein → Adenosin

Adenosin-Desaminase (EC 3.5.4.4): Adenosin → Inosin

Adenosin-Kinase (EC 2.7.1.2): Adenosin → AMP

Purin-Nukleosid-Phosphorylase (EC 2.4.2.1): Inosin → Hypoxanthin

Xanthin-Oxidase (EC 1.3.2.3): Hypoxanthin → Xanthin → Urat

Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.8): Hypoxanthin → IMP

1.3.1 AMP-Desaminase (EC 3.5.4.6)

Die AMP-Desaminase spielt eine zentrale Rolle bei der Umwandlung von Adenosin-Nukleotiden zu Inosin und Guanin-Nukleotiden, bei der Stabilisierung des Adenylat-Energiehaushalts und bei Reaktionen des Purin-Nukleotid-Kreislaufs. Sie katalysiert die irreversible hydrolytische Desaminierung von 5'-AMP zu equimolaren Anteilen von 5'-IMP und Ammoniak (88).

Die AMP-Desaminase ist durch eine Multigenfamilie bei Nagern und Mensch charakterisiert. Im menschlichen Gewebe konnten vier Isoenzyme der AMP-Desaminase isoliert werden. Die Benennung richtet sich nach den Geweben, aus denen sie ursprünglich isoliert wurden: M (Muskel), L (Leber), E1 und E2 (Erythrozyten) (61). Mit Ausnahme der E-Isoformen bestehen nur schwache oder gar keine Kreuzreaktivitäten zwischen den AMPD-Isoenzymen. Das Isoenzym E2 konnte zwar mittels Chromatographie und Elektrophorese vom Isoenzym E1 getrennt werden, es konnte jedoch später gezeigt werden, dass 3 Isoformen auf das AMPD3-Gen, dass die Erythrozyten-AMP-Desaminase kodiert, durch alternatives Spleißen zurückzuführen sind (52). In der Skelettmuskulatur verschiedener Spezies konnten immunologisch drei verschiedene Isoenzyme isoliert werden (23). Es sind bei Ratten drei verschiedene Isoenzyme (A, B, C) der AMP-Desaminase bekannt. Diese wurden in Muskulatur (A), Leber, Niere (B) und Herz (C) gefunden und zeichnen sich durch unterschiedliche kinetische, physikalische und immunologische Eigenschaften aus (60). Die Proteinprodukte des AMPD1- und AMPD2-Gens von Ratte und Mensch zeigen eine Kreuzreaktivität. Das AMPD1-Gen produziert Transkripte, die für die Ratten-Isoform A und die humane Isoform M kodieren, das AMPD2-Gen produziert Transkripte, die die Ratten-Isoform B und die humane Isoform M kodieren (56). Die cDNA für das AMP-Desaminase Gen der Herzisoform bei Mäusen ähnelt in der kodierenden Region der Erythrozytenisoform des humanen AMP-Desaminase-Gens und ist bei Mäusen auf Chromosom 7 lokalisiert (87).

Beim Menschen geht ein Mangel an muskulärer AMP-Desaminase mit Muskelschwäche und Krämpfen einher. So beschrieben Fishbein et al. 1978 in fünf Fällen ein isoliertes vererbbares AMPD-Mangel-Syndrom (22). Bei Herzinsuffizienz wurde eine Assoziation zwischen der Existenz einer AMPD1-Mutation und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit eines Überlebens ohne Herztransplantation festgestellt, wobei der Mechanismus unbekannt ist, der hier offenbar zu einer Kardioprotektion führt (50).

1.3.1.1 Enzymkinetik

Die Enzymkinetik der AMP-Desaminase wurde bereits eingehend bei verschiedenen Spezies untersucht. Das pH-Optimum für die AMP-Desaminase von Rattenherzen liegt bei pH=6.8, die Molekularmasse beträgt 81 kDa. Strukturell gesehen ist die AMP-Desaminase ein Tetramer. In Gegenwart von 100 mM KCl zeigt das Enzym eine sigmoidale Substrat-Sättigungskurve. Die Michaelis-Konstante liegt bei $K_M=5.8$ mM (AMP) und die Maximalgeschwindigkeit beträgt $V_{max} = 11.1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ (81).

Vergleichende Studien der Kinetik der kardialen AMP-Desaminase von Ratte und Mensch zeigen, dass die Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) bei Ratten etwa doppelt so hoch und die Michaelis-Konstante (K_M) bei Menschen etwa 2.5-fach höher ist (79). In einer anderen Studie wurde die Aktivität der kardialen AMP-Desaminase bei der Ratte 9-fach höher als die der AMP-Desaminase beim Menschen angegeben (46).

1.3.1.2 Effektoren der AMP-Desaminase

In bisherigen Studien wurden *in vitro* mögliche Effektoren der AMP-Desaminase untersucht, die die Aktivität des Enzyms modulieren könnten. Ob diese Effektoren tatsächlich *in vivo* eine Rolle spielen, oder ob die Umsatzrate der AMP-Desaminase durch andere Mechanismen reguliert wird, wurde bisher nicht abschließend geklärt.

Thakkar et al. untersuchten an gereinigter AMP-Desaminase von Kaninchenherzen die Protein-Kinase-C-vermittelte Phosphorylierung. Unter diesen Bedingungen zeigten sie, dass eine Phosphorylierung der AMP-Desaminase zu einer deutlichen Reduzierung des K_M -Werts von 5.6 mM auf 1.2 mM ohne Einfluss auf V_{max} führte. Sie zogen daraus den Schluss, dass die Umsatzrate der AMP-Desaminase von einem Phosphorylierungs-Dephosphorylierungsmechanismus abhängig sein muss (82). Unter phosphatfreien Bedingungen beim Kaninchenherzen zeigt die AMP-Desaminase eine irreversible

Konvertierung in ein Pseudoisoenzym mit anderen kinetischen, regulatorischen und stabilisierenden Eigenschaften. Die Michaelis-Konstante ist dabei überraschenderweise um das 10-fache kleiner ($K_M=0.54$ mM AMP) als mit Phosphat, die maximale Aktivität beträgt $V_{max}=1.4 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ (80).

Hu et al. zeigten ebenfalls, dass in adulten Rattenkardiomyozyten die Aktivität der AMP-Desaminase durch Protein Kinase C erhöht wird. Der gleiche Effekt wurde auch durch alpha-adrenerge Stimulation und cAMP hervorgerufen (38). Die gleiche Arbeitsgruppe postulierte, dass intrazelluläres Adenosin durch einen unbekanntem Mechanismus die IMP-Produktion von adulten, isolierten Rattenmyozyten um das 2-fache erhöht, wobei ein direkter Effekt von Adenosin auf die AMP-Desaminase, eine über Adenosin-Rezeptoren vermittelte Modulation und ein Einfluss des Transmethylierungsweges ausgeschlossen wurden (39).

Die AMP-Desaminase von Kaninchenherzen wird durch ATP und ADP allosterisch aktiviert. Der K_M -Wert sinkt dann auf 1.7 mM. Das Enzym wird durch GTP, Coformycin, Coformycin-5'-Phosphat, Palmitoyl-CoA, inorganische Phosphatverbindungen und dem Metall-Chelator o-Phenantrolin inhibiert. Es wurde keine Inhibition durch IMP oder Nikotinamid-Nukleotiden festgestellt (81).

1.3.1.3 Regulation der AMP-Desaminase-Aktivität

Auch wenn bisher kein umfassendes Modell der Regulation der AMP-Desaminase entwickelt wurde, so gibt es doch zahlreiche Einzelbefunde: Auf zellulärer Ebene wurden verschiedene Modelle verwendet, um den Einfluss von oxidativem Stress auf die molekularen, kinetischen und regulatorischen Eigenschaften der AMP-Desaminase zu untersuchen. So wurde ein Oxidationssystem bei der kardialen AMP-Desaminase von Kaninchen verwendet. Wenn die AMP-Desaminase oxidativem Stress ausgesetzt wird, sinkt die Enzymaktivität innerhalb von 5 Minuten um das 7-fache, nach 15 Minuten kommt es zu einer irreversiblen Inaktivierung. Durch den oxidativen Stress kommt es zu keiner Veränderung der molekularen Masse, tetrameren Struktur, des K_M -Wertes, der Immunreaktivität und trypsinolytischer Muster. Die Autoren vermuten, dass es zu einer Konversion der Thiol-Bindungsstellen in einen stabilen höher oxidativen Zustand kommt, da die AMP-Desaminase sensibel auf die S-Thiolierung und Thiol-Alkylierung reagiert (41).

Ein anderes Modell untersuchte die Aktivität der AMP-Desaminase adulter Rattenkardiomyozyten, indem eine rasche ATP-Depletion herbeigeführt wird (rapid deenergization). Die Befunde lassen den Schluss zu, dass die AMP-Desaminase durch

Produkte der anaeroben Glykolyse reguliert wird. Die IMP-Produktion in Zellen, deren Zellatmung vor der ATP-Depletion nicht inhibiert worden war, lag 4-fach höher als in Zellen, deren ATP-Gehalt erhalten blieb, aber einer anaeroben Glykolyse unterlagen. Weiterhin führte eine alpha-adrenerge Stimulation, wie in anderen Studien auch, zu einer Stimulation der AMP-Desaminase (37).

Die gleiche Arbeitsgruppe zeigte in dem gleichen Modell an Kardiomyozyten von neugeborenen Schweinen, dass die Aktivität der AMP-Desaminase vom hormonellen und metabolischen Status der Zellen vor der ATP-Depletion abhängt. Die Vorbehandlung der Zellen mit Adenosin führt zu einem höheren Umsatz von AMP zu IMP. Dies könnte laut Autoren bei der Präkonditionierung eine Rolle spielen. Weiterhin konnte in dieser Studie eine gesteigerte IMP-Produktion durch den Protein-Kinase-C-Inhibitor Staurosporin zu 90% inhibiert werden, der beta-adrenerge Agonist Isoproterenol stimulierte die AMP-Desaminase und der cAMP-Spiegel korrelierte mit der IMP-Bildung (36).

Bei retrograd perfundierten, isolierten Kaninchenherzen führte eine Mangelperfusion zu einer Abnahme der AMP-Hydrolyse. Dies wurde auf eine geringere Aktivität der zytosolischen 5'-Nukleotidase zurückgeführt, die auch nicht durch eine zusätzliche hypoxische Minderperfusion reaktiviert wurde. Im venösen Effluat wurden 30% weniger Purine als erwartet gefunden. Daraus schlossen die Autoren, dass die AMP-Hydrolyse zu Adenosin bei früher Ischämie führend ist, in einer zweiten Ischämiephase kommt es dann zu einer Inhibition der AMP-Hydrolyse, anscheinend – so die Interpretation – durch die Akkumulation von IMP (28).

In einem Rattenherz-Modell mit 2-Deoxy-D-Glucose-Perfusion mit einem niedrigen Gehalt an Pi wurde eine hohe Freisetzung von Inosin und eine niedrige Freisetzung von Adenosin festgestellt. Der Beitrag des IMP-Abbauweges liegt bei 97%. Im Gegensatz dazu steht das anoxische Modell, das sich durch einen hohen Gehalt an Pi auszeichnet. Hier werden gleich hohe Anteile von Adenosin und Inosin gefunden. Der IMP-Abbauweg hat dabei einen Anteil von 23% und der Adenosin-Abbauweg einen Anteil von 77%. Daraus wurde gefolgert, dass Pi die AMP-Desaminase im anoxischen Herzen inhibiert (11;12). Die genannten Studien lassen aber offen, welchen Beitrag die AMP-Desaminase zum AMP-Stoffwechsel *in vivo* leistet, und welche Bedeutung sie bei moderater Einschränkung des O₂-Angebotes hat.

1.3.2 5'-Nukleotidase (EC 3.1.3.5)

Im Myokard von Säugetieren existieren zwei unterschiedliche 5'-Nukleotidase-Systeme, von denen eine Isoform membranständig (ekto) und die andere löslich zytosolisch aktiv ist (53). Es konnten in einer Studie bei verschiedenen Spezies (Ventrikelmyokard vom Menschen, Kaninchen, Meerschweinchen, Tauben, Ratten und Schildkröten) erhebliche Unterschiede in den Aktivitäten sowie Verteilungen der 5'-Nukleotidase festgestellt werden (55).

Die globale kardiale Adenosin-Bildungsrate liegt, wie bereits oben erwähnt, in Meerschweinchenherzen bei $2.3 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, davon werden etwa 8% des Adenosins extrazellulär durch die 5'-Nukleotidase gebildet und 70% werden in die zellulären Regionen aufgenommen. Neuere Studien unseres Labors konnten an intakten Meerschweinchenherzen mittels ^{31}P -NMR-Messung zeigen, dass die Umsatzrate der 5'-Nukleotidase über die freie zytosolische AMP-Konzentration reguliert wird (18). Frühere Studien anderer Gruppen interpretierten den massiven Anstieg der Purinnukleosidfreisetzung in Hypoxie oder Ischämie dahingehend, dass die Aktivität der 5'-Nukleotidase durch diese Stoffwechselsituationen reguliert wird (30;34). Es konnte jedoch in unserem Labor gezeigt werden, dass eine Hemmung der Adenosin-Kinase durch Hypoxie letztlich zu einem Anstieg der Purinfreisetzung führt (18). Desweiteren gilt Magnesium als ein allosterischer Effektor der 5'-Nukleotidase und verstärkt die Adenosin-Bildung. In Inhibitorstudien am isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen wurde gezeigt, dass die durch Magnesium aktivierte Purinfreisetzung hauptsächlich über die Ekto-5'-Nukleotidase katalysiert wird (53). Durch Inhibition der 5'-Nukleotidase mit alpha,beta-Methylen-Adenosin-5'-diphosphat (AOPCP, 50 μM) wurde die Purinnukleosidfreisetzung im venösen Effluat in Ischämie um 41% gesenkt (25). Dagegen konnte in unserem Labor mit Inhibition der 5'-Nukleotidase durch AOPCP ein etwa 10-facher Anstieg der Adenosin-Nukleotide unter basalen Bedingungen gesehen werden, während die Adenosin-Freisetzung unverändert blieb. In Hypoxie kam es zu einem 3-fachen Anstieg der Adeninnuklotidfreisetzung, aber zu einem 40-fachen Anstieg der Adenosin-Freisetzung (9).

1.3.3 Adenosin-Desaminase (EC 3.5.4.4)

Adenosin wird durch die Adenosin-Desaminase zu Inosin desaminiert. Decking und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Blockade der Adenosin-Desaminase am Meerschweinchenherzen durch EHNA zu einem 2.5-fachen Anstieg der Adenosin-Freisetzung in Normoxie führte. In Hypoxie wurde ein 3-facher Anstieg der Adenosin-

Freisetzung beobachtet. Anhand eines mathematischen Modells wurde abgeschätzt, dass etwa 15% des gebildeten Adenosins ($0.3 - 0.5 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) durch die Adenosin-Desaminase zu Inosin metabolisiert wird (18). Die Enzymaktivität liegt im Homogenat von Meerschweinchenherzen bei $2.7 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

1.3.4 Purin-Nukleosid-Phosphorylase (EC 2.4.2.1)

Die Purin-Nukleosid-Phosphorylase baut Inosin zu Hypoxanthin ab. Histochemische Untersuchungen haben eine hauptsächlich endotheliale Aktivität der Purin-Nukleosid-Phosphorylase gezeigt (8). Durch die Blockade des Enzyms mit 8-Aminoguanosin in Kardiomyozytenkulturen wird der Anteil von Inosin, der in die Nukleotide eingebaut wird, deutlich reduziert (90). Inosin wird also nach Ansicht der Autoren erst nach dem Abbau zu Hypoxanthin in IMP eingebaut.

1.3.5 Xanthin-Oxidase (EC 1.3.2.3)

Die Xanthin-Oxidase - ein Eisensulfat-Molybdän-Flavoprotein - vermittelt unter Oxidation die Metabolisierung von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zu Harnsäure. Bei diesem Vorgang entstehen auch Superoxidradikale. Das Enzym wurde durch immunhistochemische Untersuchungen ausschließlich im Endothel von Kapillaren nachgewiesen (42).

Bei einem autosomal-rezessiv vererbten Defekt der Xanthin-Oxidase sinken beim Menschen die Harnsäurespiegel, während die Xanthin- und Hypoxanthinwerte im Blut und Harn ansteigen. Dadurch kann es zur Ausbildung von Xanthinierensteinen kommen.

Das Endothel im mikrovaskulären Gefäßbett ist der Hauptort für die Entstehung von Harnsäure, da sich hier die Xanthin-Oxidase finden lässt. Das makrovaskuläre Endothel enthält hingegen keine Xanthin-Oxidase, so dass die Purine hier lediglich bis zu Hypoxanthin abgebaut werden. Das Enzym spielt eine bedeutende Rolle bei der Bildung von Sauerstoffradikalen nach der postischämischen Reperfusion im Myokard. Sauerstoffradikale tragen zur kontraktile Dysfunktion nach Ischämie bei (27).

Diese Annahme konnte durch Inhibition der Xanthin-Oxidase bestätigt werden, da es bei Inhibition nach globaler Ischämie zu einer deutlichen Verbesserung der myokardialen Kontraktilität kam (32).

1.3.6 Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.8)

Die Purin-Basen Hypoxanthin und Guanin werden durch die HGPRT zu GMP oder IMP unter Freisetzung von Pyrophosphat wiederverwertet. Bei einem Defekt oder bei völliger Inaktivität des X-chromosomal kodierten Enzyms kommt es zu einer massiven Purinsynthese-Steigerung. Der Grund liegt im Wegfall der allosterischen Hemmwirkung von IMP und GMP auf die Glutamin-PRPP-Amidotransferase, dem Schlüsselenzym der Purin-Biosynthese. Dieses als Lesch-Nyhan-Syndrom bekannte Krankheitsbild führt zu schweren zentralnervösen Störungen, Hyperurikämie und Nierensteinleiden.

In Kulturen schlagender Kardiomyozyten wurde eine hohe Aktivität der HGPRT beobachtet, wodurch der Anteil des Hypoxanthin, der zu IMP wiederverwertet wird, denjenigen Anteil der zu Xanthin und Harnsäure abgebaut wird, sogar übersteigt (90). Dieser Befund widerspricht allerdings einer früheren Studie der gleichen Arbeitsgruppe, bei der eine langsame Wiederverwertung von Hypoxanthin zu IMP beobachtet wurde (91).

1.4 Inhibition der am Purin-Stoffwechsel beteiligten Enzyme

Wie bereits zuvor in Kap. 1.2, Abb. 1.1 dargestellt, wird AMP einerseits über die AMP-Desaminase zu IMP und anschließend über die IMP-spezifische Isoform der 5'-Nukleotidase (cN-II) zu Inosin metabolisiert. Andererseits wird AMP über die AMP-spezifische 5'-Nukleotidase (cN-I) zu Adenosin und daraufhin über die Adenosin-Desaminase ebenfalls zu Inosin abgebaut. Die Bedeutung dieser beiden Metabolisierungswege kann durch die effektive Blockade der beteiligten Enzyme bestimmt werden. Bei Blockade der ADA wird Inosin nicht mehr aus Adenosin, sondern ausschließlich aus IMP gebildet. Zwar hat die Blockade der ADA einen Anstieg der Adenosin-Konzentration, und damit sowohl der Adenosin-Freisetzung als auch der Adenosin-Rephosphorylierung zur Folge. Aber angesichts der hohen Umsatzrate der Myokinase-Reaktion dürfte die AMP-Konzentration nur wenig verändert werden, und die Umsatzrate der AMP-Desaminase ebenfalls. Die Freisetzungsrates von Inosin ist somit direkt von der Umsatzrate der AMP-Desaminase abhängig. Inosin wird im Regelfall weiter zu Hypoxanthin, Xanthin und Harnsäure abgebaut, wobei Xanthin aber auch aus Guanin gebildet werden kann. Blockiert man nun den Umsatz von Hypoxanthin und Xanthin, also die Xanthin-Oxidase, so sollte die Freisetzung von Inosin und Hypoxanthin ausschließlich von dem Abbau von IMP zu Inosin abhängen, und somit ein quantitativ verlässliches Maß für die Umsatzrate der AMP-Desaminase sein. Um die Umsatzrate der AMP-Desaminase über die koronarvenöse Inosin- und Hypoxanthin-Freisetzung bestimmen

zu können, wurde die Adenosin-Desaminase mit EHNA und die Xanthin-Oxidase mit Allopurinol blockiert. Die Versuche erfolgten in Normoxie und Hypoxie (40% O₂). Eine spezifische Blockade der AMP-Desaminase wurde mit Coformycin und den Coformycin-Analoga GP 3521 und GP 3449 durchgeführt. Um den Einfluss der Purin-de-novo-Synthese zu überprüfen, wurde Methotrexat, das die Aktivität der Dihydrofolatreduktase und damit die Bildung von Tetrahydrofolat hemmt, eingesetzt. Tetrahydrofolat spielt eine wichtige Rolle bei der Purin-Biosynthese.

1.5 Fragestellung

Der Anteil des IMP-Weges und die damit verbundene Bedeutung der AMP-Desaminase in Normoxie und Hypoxie ist bisher Gegenstand der Diskussion und wurde nicht abschließend geklärt. Um diesen Stoffwechselweg zu charakterisieren, wurden in der vorliegenden Arbeit am isolierten, retrograd perfundierten Meerschweinchenherzen Inhibitoren der im Adenin-Nukleotid-Stoffwechsel beteiligten Enzyme sowie direkte Inhibitoren der AMP-Desaminase verwendet und die Purine und deren Metabolite im koronarvenösen Effluat mittels HPLC bestimmt.

Da die Bildung von IMP aus AMP die Adenosin-Bildung tendenziell beeinträchtigt, aber zu keinem funktionell aktiven Metaboliten führt, ist diese Frage auch pharmakologisch von Bedeutung. Hemmung der AMP-Desaminase könnte in Hypoxie/Ischämie die Bildung von Adenosin mit seinen kardioprotektiven Wirkungen potenzieren und so ein attraktives therapeutisches Prinzip sein. Die quantitative Bedeutung der AMP-Desaminase soll daher in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Modelle

2.1.1 *Isolierte Perfusion nach Langendorff*

2.1.1.1 *Präparation*

Meerschweinchen (300 - 400 g) wurden mit einem Schlag auf das Genick getötet und auf einem OP-Tisch fixiert. Nach dem Bauchschnitt wurde der Brustkorb eröffnet und das Herz freipräpariert. Das schlagende Herz wurde sofort mit einer eisgekühlten physiologischen Kochsalzlösung stillgestellt, die Aorta ascendens unter Sicht aufgesucht und distal der Abgänge der Herzkranzgefäße durchtrennt. Durch leichte Massage des Herzens wurden restliche Luftblasen aus der Aorta entfernt. Die Aorta wurde dann kanüliert, an die Versuchsanlage gehängt und retrograd mit einem Krebs-Henseleit-Medium (NaCl 116, KCl 4.63, KH₂PO₄ 1.18, Mg₂SO₄ 1.1, NaHCO₃ 24.9, Glukose Monohydrat 8.32, Pyruvat 2.0, CaCl₂ 2.52 mmol/l, 37°C, pH 7.4, >30 Minuten mit Carbogen begast) bei einem Perfusionsdruck von 70 cm H₂O perfundiert. Das Perikard wurde anschließend entfernt und die Mitralklappe eingeschnitten, um über den linken Vorhof einen Latexballon (Größe 5) in den linken Ventrikel einzuführen. Darüber wurde mit einem Druckaufnehmer der linksventrikuläre Druck aufgezeichnet. Das Herz wurde über je eine Nadelelektrode im linken Herzohr und im linken Ventrikelmyokard mit einer Frequenz von 300 · min⁻¹ stimuliert. Der Perfusionsdruck wurde unmittelbar oberhalb der Aorta abgeleitet. Der koronare Fluss wurde mit einem Flowmeter (T 208 Transonic Volume Flowmeter, Transonic Systems Inc.), der linksventrikuläre Druck (mmHg), die hieraus abgeleitete Herzfrequenz (min⁻¹) und der Perfusionsdruck (mmHg) über einen Schreiber (WK-821-AR, Wekagraph) kontinuierlich graphisch registriert. Eine Gasmischpumpe diente der Kontrolle der Begasung des hypoxischen Mediums.

2.1.1.2 *Versuchsanlage*

Wie in Abbildung 2.1 zu sehen, war das Herz mit der Aorta an der Kanüle der Langendorff-Anlage fixiert und wurde mit Medium perfundiert. Das Medium befand sich in einem Perfusionsrohr, das mit einer Vorratsflasche verbunden war. Um das Herz ständig mit einem Perfusionsdruck von 70 cm H₂O zu perfundieren, wurde der Perfusionsdruck in der dicht abgeschlossenen Vorratsflasche durch Begasung aufgebaut, die Höhe des Drucks wurde durch ein Steigrohr eingestellt. Um eine konstante Temperatur von 37° C zu gewährleisten, war das Herz selbst von einem temperierten Glasmantel umschlossen, die mit Medium

gefüllte Vorratsflasche und das Perfusionsrohr befanden sich in einem temperierten Wärmebad. Das Medium wurde im Perfusionsrohr und in der Vorratsflasche mit einem normoxischen Gasmisch (95 % O₂, 5% CO₂) äquiliert. Um während der Versuche von normoxischen auf hypoxische Bedingungen umschalten zu können, wurde ein zweites Perfusionsrohr und eine zweite Vorratsflasche installiert, die mit einem hypoxisch äquilierten Medium (40% O₂, 55% N₂ und 5% CO₂) gefüllt waren. Durch einen Umschalthebel konnte die Aortenkanüle mit diesem Perfusionsrohr verbunden werden. Mit einer Gasmischpumpe wurde das Gasmisch des hypoxischen Mediums kontrolliert. Um von einer druckkonstanten zu einer flusskonstanten Perfusion wechseln zu können, wurde eine Rollerpumpe (Minipuls 3, Abimed Gilson) zwischen Aortenkanüle und Perfusionsrohr geschaltet.

Inhibitoren wurden mit einer Perfusorpumpe (Precidor, Infors AG, Basel) seiteständig infundiert.

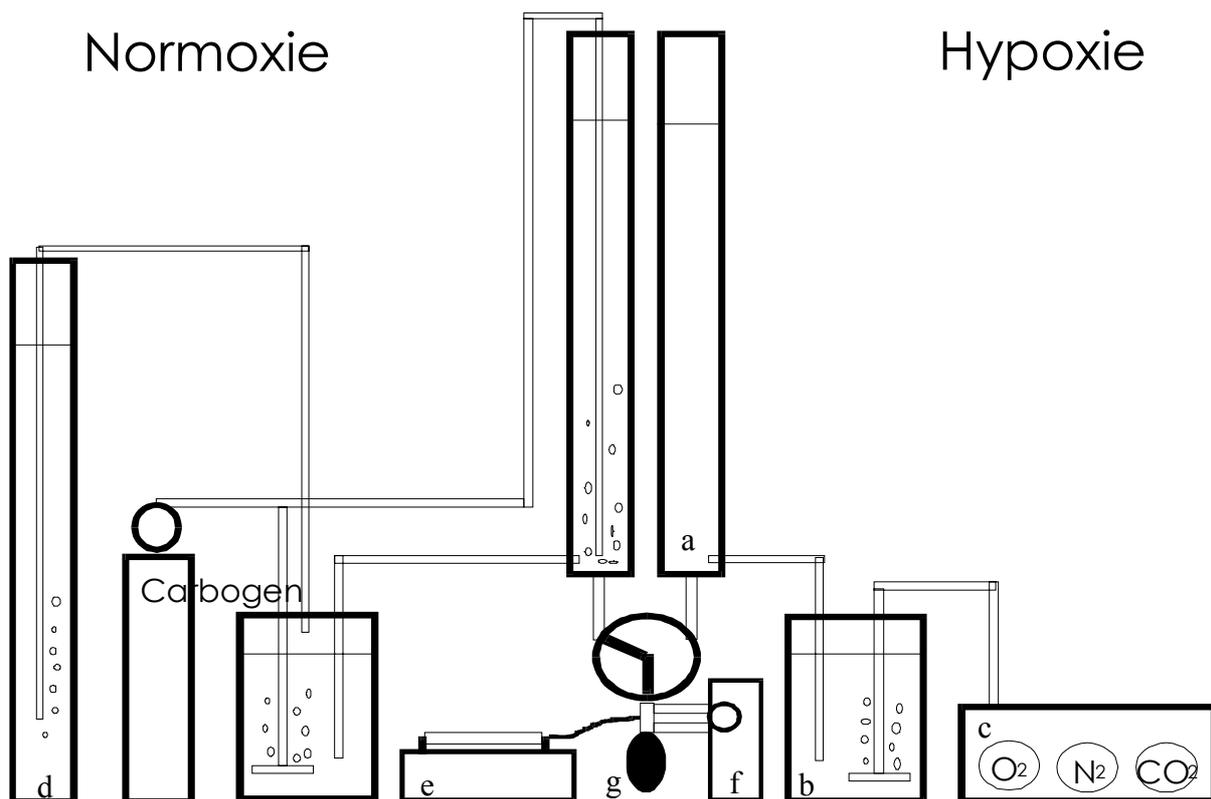


Abb. 2.1: Versuchsaufbau: a) Perfusionsrohr, b) Vorratsflasche, c) Gasmischpumpe, d) Steigrohr, e) Perfusorpumpe, f) Rollerpumpe, g) perfundiertes Herz

2.1.1.3 Generelle Versuchsdurchführung

In der Einschlagphase mit druckkonstanter Perfusion erreichte der koronare Fluss innerhalb von 20 Minuten ein konstantes Niveau (Abb. 2.2). Die Herzen wurden darauf im Abstand von 5 Minuten zwei Ischämien über jeweils 20 Sekunden ausgesetzt, um bei der sich anschließenden reaktiven Hyperämie die Reaktivität der Koronargefäße zu überprüfen. Anschließend wurde auf eine flusskonstante Perfusion umgestellt, bei der das zuvor erreichte Flussniveau beibehalten wurde. Zu Beginn der Versuchsphase wurde die basale Purinfreisetzung in Normoxie bestimmt. Zu festgesetzten Zeitpunkten wurden die koronarvenösen Effluat aufgefangan. Die Sammelgefäße fassten circa 20 ml. Die Sammelzeit wurde protokolliert. Anschließend wurden wie unten beschrieben (s. 2.3.1, 2.3.2) einzelne Enzyme selektiv gehemmt, oder nach einer Ischämie definierter Dauer (s. 2.3.4) die Akkumulation von Adenosin-Nukleotiden und ihren Abbauprodukten im Myokard bestimmt.

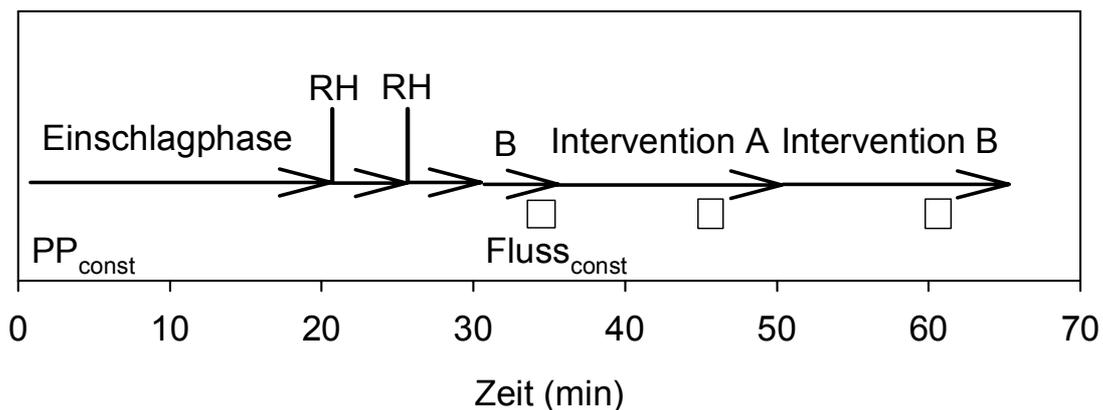


Abb. 2.2: Allgemeiner Versuchsablauf, **RH**=reaktive Hyperämie nach 20 Sekunden Ischämie (schwarze Balken), **B**=basale Purinfreisetzung, \square =Probennahme, **PP_{const}**=druckkontrollierte Perfusion, **Fluss_{const}**=flusskontrollierte Perfusion

2.1.2 Enzymaktivität im Gewebehomogenat

Es wurde Meerschweinchenherzen wie unter 2.1.1.1 beschrieben präpariert. Die Herzen wurden fünf Minuten retrograd mit normoxischem Krebs-Henseleit-Puffer gespült. Darauf wurden die Herzen in jeweils 9 ml kalten Inkubationspuffer (20 mmol/l TrisHCl, pH 7.0, 150 mmol/l KCl, 1 mmol/l Dithiothreitol) mit einem Mixer (Ultra Thurrax) homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 8000 U/min bei 4° C 20 min. zentrifugiert. Vom Überstand (8 - 10 ml) wurden 2.5 ml auf eine Sephadex PD-10 Chromatographie-Säule gegeben und eluiert. Das

Volumen betrug anschließend 3.5 - 6.5 ml. Davon wurden pro Testansatz 50 µl entnommen. Der Testansatz bestand aus 50 µl der gereinigten Proteine, 400 µl Inkubationspuffer sowie 50 µl AMP in unterschiedlichen Konzentrationen. Die Testansätze wurden für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und das Enzym im Testansatz anschließend mit einem Säureextrakt (500 µl 2 mol/l HClO₄) ausgefällt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand neutralisiert (400 µl 2 mol/l K₃PO₄).

2.1.3 *Isolierte Kardiomyozyten*

Rattenkardiomyozyten wurden nach dem Protokoll von Stumpe und Schrader (1997) isoliert. Dazu wurden zwei Wistar-Ratten (250 - 350 g) mit Ether narkotisiert, die Herzen entnommen und retrograd mit einem modifizierten, Ca²⁺-freien Krebs-Henseleit-Puffer (NaCl 110, KCl 2.6, KH₂PO₄ 1.2, Mg₂SO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, Glukose 11 mmol/l, Carbogen gesättigt) von Blut freigespült. Nach Zugabe von 0.025% Kollagenase und 13 µl 100 mmol/l Ca²⁺ wurden die Herzen bei 37°C für 40 Minuten rezirkulierend mit einem Volumen von ca. 100 ml perfundiert. Anschließend wurde das Herzgewebe mit einem Gewebehacker (Bachofer GmbH, Reutlingen) zerlegt und im kollagenasehaltigen Perfusat, dem 1% BSA (Fr. V, ICN-Flow, Meckenheim) zugegeben wurde, für 15 Minuten inkubiert. Vorsichtiges Pipettieren der Inkubationslösung (Ausüben von schwachen Scherkräften) unterstützte die Dissoziation der Zellen aus dem Gewebeverband. Die nachfolgenden Aufreinigungsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Filtration der Zellsuspension durch Nylongaze (Maschenweite 200 µm) wurde das Filtrat 3 Minuten bei 20 g zentrifugiert, das Pellet mit den Kardiomyozyten in KHB mit 0.2 mmol/l Ca²⁺ resuspendiert und erneut zentrifugiert (3 Minuten, 20 g). Dieses Pellet wurde in KHB mit 0.5 mmol/l Ca²⁺ aufgenommen und auf KHB mit 1 mmol/l Ca²⁺ und 4% BSA aufgeschichtet. Nach erneuter Zentrifugation für 2 Minuten bei 10 g wurde der Bodensatz mit den Kardiomyozyten in 5 ml Inkubationspuffer (NaCl 137, KCl 5.4, NaH₂PO₄ 1.0, Glukose 5.5, TRIS 5.0, MgSO₄ 0.8, CaCl₂ 2 mmol/l, pH 7.4) aufgenommen. Anschließend wurden die Kardiomyozyten mit dem Inhibitor inkubiert.

2.2 Inhibitoren

2.2.1 *Inhibition der Adenosin-Desaminase durch EHNA*

Erythro-9-(2-Hydroxy-3-nonyl)adenin (EHNA) ist ein potenter Inhibitor der Adenosin-Desaminase. EHNA ist ebenfalls ein Inhibitor der cGMP-stimulierten Phosphodiesterase im Myokard von Schweinen und Mensch (64).

Der Inhibitor hat keinen Einfluss auf den kardialen Energiehaushalt und auf kardiale Adenosin-Rezeptoren (47). Bei Meerschweinchenherzen wurde eine effektive Blockade der Adenosin-Desaminase mit 5 $\mu\text{mol/L}$ beobachtet (18;20;47).

Durch die Hemmung der Adenosin-Desaminase wird ein Anstieg der Adenosin-Freisetzungsrates erwartet. Dies wurde auch schon in der Literatur in zahlreichen Studien bei unterschiedlichen Spezies beschrieben (11;12).

2.2.2 *Inhibition der Xanthin-Oxidase durch Allopurinol*

Allopurinol (Research Biochemicals International, Natick, MA, USA) ist ein potenter Inhibitor der Xanthin-Oxidase. Es findet seine medizinische Indikation als Urikostatikum bei der Therapie der Hyperurikämie.

Bei Blockade der Xanthin-Oxidase werden die Adenosin-Nukleotide und IMP nur bis Hypoxanthin abgebaut, und die Abbauprodukte der Guanin-Nukleotide als Xanthin freigesetzt. Damit ist eine Abschätzung des Einflusses des GMP-Abbaus auf die Gesamtpurinfreisetzungsrates möglich. Bei kombinierter Blockade der Adenosin-Desaminase und der Xanthin-Oxidase können wie schon oben beschrieben die koronarvenöse Inosin- und Hypoxanthin-Freisetzung als Maß für die Umsatzrate der AMP-Desaminase verwendet werden.

Zahlreiche Untersuchungen belegen die kardioprotektive Wirkung der Xanthin-Oxidase-Hemmung durch Allopurinol bei Ischämie und Reperfusion. Sie stützen die Hypothese, dass bei Reperfusion durch die Xanthin-Oxidase gebildete freie Radikale zum Reperfusionsschaden beitragen. So zeigte sich, dass Allopurinol die postischämische myokardiale Funktion verbessert, den myokardialen Schaden nach Ischämie und Reperfusion verringert (74) und gleichzeitig antiarrhythmische Effekte hat, ohne Einfluss auf den kardialen Energiestatus zu nehmen (29;32). Diese Effekte wurden bei eingesetzten Konzentrationen von 10-100 $\mu\text{mol/l}$ gefunden, wobei eine spezifische Inhibition der Xanthin-Oxidase beim Meerschweinchenherzen bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ zu erwarten ist (54).

2.2.3 Inhibition der AMP-Desaminase durch GP 3521 und GP 3449

Bei GP 3521, das freundlicherweise von der Firma Gensia Pharmaceuticals, San Diego, USA, zur Verfügung gestellt wurde, handelt es sich um ein 3-Carboxy-Tetrahydronaphthylethyl-Coformycin-Aglycon-Analogon.

In verschiedenen Studien konnte an isolierten Zellen (Kaninchen-Erythrozyten, Endothelzellen) gezeigt werden, dass GP 3521 rasch die Zellmembran permeiert und intrazellulär Konzentrationen erreicht, die ausreichen, um die AMP-Desaminase spezifisch und effektiv zu hemmen ($K_i=15$ nM). In Erythrozyten betrug die intrazelluläre Konzentration des Inhibitors nach 5 Minuten Inkubationszeit 65% der extrazellulären Konzentration (43).

Bei GP 3449 (308.15 g/mol), das ebenfalls von der Firma Gensia zur Verfügung gestellt wurde, handelt es sich um ein Derivat von GP 3521. Es zeichnet sich durch eine höhere Membrangängigkeit im Vergleich zu GP 3521 aus. Die inhibitorische Potenz ist mit $K_i=200$ nM niedriger als die von GP 3521 (Ito, B., Gensia).

Durch den Einsatz von GP 3521 und GP 3449 ist aufgrund der spezifischen und effektiven Hemmung der AMP-Desaminase eine Reduktion der IMP-Bildung und damit auch der Inosin- und Hypoxanthin-Freisetzung im koronarvenösen Effluat zu erwarten.

2.2.4 Inhibition der Adenosin-Desaminase und AMP-Desaminase durch Coformycin

Coformycin (3- β -d-ribofuranosyl-6, 7, 8-trihydroimidazo 3,4-d diazepin-8(R)-ol) ist ein Inhibitor der Adenosin-Desaminase (17;69;77), bei mikromolaren Konzentrationen von Coformycin wurde aber auch eine inhibitorische Wirkung auf die AMP-Desaminase mit 5 mmol/l AMP gezeigt (80;81).

Coformycin in einer Konzentration von 7 μ mol/l verstärkt die depressorische Wirkung von Adenosin auf die elektrische und mechanische Aktivität des Vorhofmyokards von Meerschweinchen in Hypoxie durch eine nahezu vollständige Inhibition der Adenosin-Desaminase (77).

Weiterhin besteht ein kardioprotektiver Effekt bezüglich der kardialen kontraktile und metabolischen Erholung bei Ischämie-Reperfusion-Ereignissen. Dieser Effekt wird durch den Erhalt des ATP-Spiegels und erhöhte Adenosin-Konzentrationen vermittelt. In der Reperusionsphase kommt es zu einer verstärkten Freisetzung von Adenosin (69).

2.2.5 *Methotrexat*

IMP dient in der Purin-de-novo-Synthese als Vorstufe von AMP und GMP. Für den Syntheseprozess ist Tetrahydrofolsäure essentiell. Methotrexat verdrängt als Antimetabolit Dihydrofolsäure kompetitiv von der Dihydrofolatreduktase und hemmt das Enzym. Dadurch steht Tetrahydrofolsäure für die Purinnukleotidsynthese nicht mehr zur Verfügung. Durch die Hemmung mit Methotrexat lässt sich folglich der Einfluss der Purin-de-novo-Synthese auf die Purinbildung abschätzen, und in den hier beschriebenen Versuchen auf die Purinmetabolit-Freisetzung.

2.3 **Protokolle und Fragestellungen**

2.3.1 *Abschätzung der Umsatzrate der AMP-Desaminase unter verschiedenen Bedingungen*

Für die Abschätzung der Umsatzraten der AMP-Desaminase wurde das isoliert perfundierte Meerschweinchenherz nach Langendorff verwendet. Es wurden pharmakologische Interventionen mit Inhibitoren (s.u.) bei unterschiedlicher Oxygenierung des Mediums (Normoxie mit 95% O₂, 5% CO₂, Hypoxie mit 40% O₂, 55% N₂, 5% CO₂) durchgeführt.

2.3.1.1 *EHNA und Allopurinol*

Eine 1 mmol/l EHNA-Stammlösung und eine 1 mmol/l Allopurinol-Stammlösung wurden seitenständig so infundiert, dass die Endkonzentration für EHNA bei 5 µmol/l und für Allopurinol bei 10 µmol/l lag. Nach 5 Minuten wurde das koronarvenöse Effluat in 2 Proben aufgefangen. Anschließend wurde für die restliche Versuchsdauer die Perfusion auf das hypoxische Medium (40% O₂) umgeschaltet. Nach fünf Minuten hypoxischer Perfusion wurden 2 weitere Proben gesammelt (Abb. 2.3, n=6).

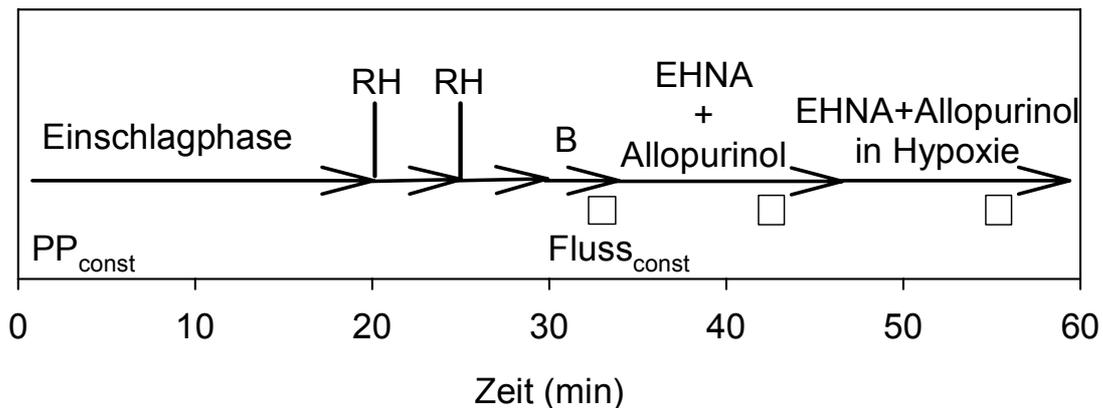


Abb. 2.3: EHNA 5 $\mu\text{mol/l}$ und Allopurinol 10 $\mu\text{mol/l}$, **RH**=reaktive Hyperämie nach 20 Sekunden Ischämie (schwarze Balken), **B**=basale Purinfreisetzung in Normoxie, \square =Probenentnahme, **PP_{const}**=druckkontrollierte Perfusion, **Fluss_{const}**=flusskontrollierte Perfusion

2.3.1.2 GP 3521

Eine spezifische und effektive Hemmung der AMP-Desaminase sollte eine direkte Bestimmung der Umsatzrate der AMP-Desaminase ermöglichen. In dieser Versuchsreihe ($n=4$) wurde GP 3521 in aufsteigenden Konzentrationen (0.01 $\mu\text{mol/l}$, 0.1 $\mu\text{mol/l}$, 1 $\mu\text{mol/l}$, 5 $\mu\text{mol/l}$) eingesetzt. Zusätzlich wurde am Ende der Versuche EHNA über 5 Minuten appliziert, um auch die Adenosin-Desaminase zu hemmen. Somit konnte der jeweilige Anteil der AMP-Desaminase und der Adenosin-Desaminase an der koronarvenösen Freisetzung von Inosin und Hypoxanthin abgeschätzt werden.

Für die Endkonzentrationen 0.01 $\mu\text{mol/l}$ und 0.1 $\mu\text{mol/l}$ wurde eine 10 $\mu\text{mol/l}$ GP 3521-Stammlösung, für die Endkonzentrationen 1 $\mu\text{mol/l}$ und 5 $\mu\text{mol/l}$ eine 500 $\mu\text{mol/l}$ GP 3521-Stammlösung entsprechend infundiert. Nach jeweils 5 Minuten Infusionsdauer einer Konzentrationsstufe wurde das koronarvenöse Effluat in 2 Proben gesammelt. Abschließend wurde die Endkonzentration von GP 3521 von 5 $\mu\text{mol/l}$ auf 1 $\mu\text{mol/l}$ reduziert und zusätzlich eine 1 mmol/l EHNA-Stammlösung in einer Endkonzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ kontinuierlich appliziert. Nach fünf Minuten wurde das Effluat in 2 Proben aufgefangen (Abb. 2.4).

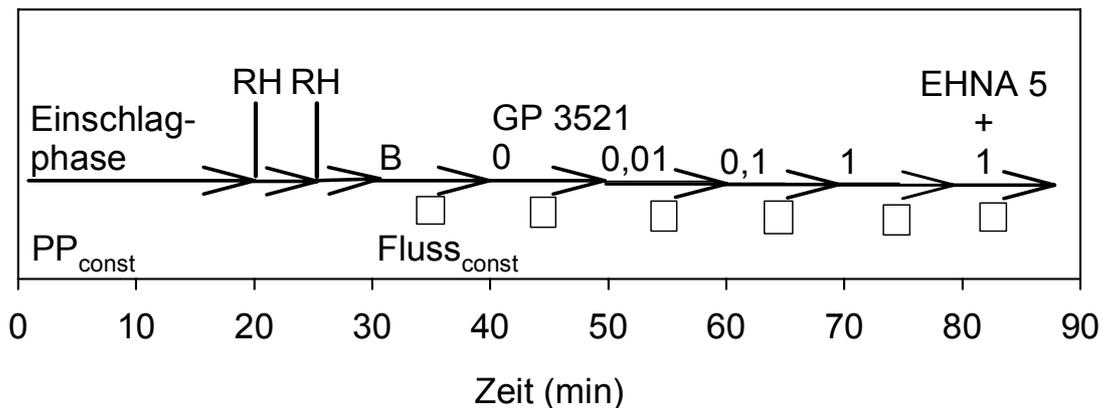


Abb. 2.4: GP 3521 in aufsteigenden Konzentrationen ($\mu\text{mol/l}$) und EHNA $5 \mu\text{mol/l}$, **RH**=reaktive Hyperämie nach 20 Sekunden Ischämie (schwarze Balken), **B**=basale Purinfreisetzung in Normoxie, \square =Probennahme, **PP_{const}**=druckkontrollierte Perfusion, **Fluss_{const}**=flusskontrollierte Perfusion

2.3.1.3 Effekte von GP 3521 unter hypoxischen Bedingungen

In einer zweiten Versuchsreihe ($n=4$) mit GP 3521 wurde die Freisetzung von Adenosin und Inosin unter hypoxischen Bedingungen gemessen, da bei reduziertem O_2 -Angebot eine höhere AMP-Konzentration und somit eine höhere Umsatzrate der AMP-Desaminase zu erwarten war. Am Ende der Versuche wurde zusätzlich EHNA eingesetzt, um die Adenosin-Desaminase zu hemmen. Auch hier war das Ziel, den jeweiligen Anteil der Enzyme AMP-Desaminase und Adenosin-Desaminase an der Purinfreisetzung zu bestimmen.

In Hypoxie ($40\% \text{O}_2$) wurde zunächst die basale Purinfreisetzung bestimmt. Anschließend wurde GP 3521 in einer Endkonzentration von $0,1 \mu\text{mol/l}$ infundiert und im Abstand von 5 und 3 Minuten jeweils 2 Proben gesammelt. Danach wurde EHNA in einer Endkonzentration von $5 \mu\text{mol/l}$ appliziert und nach 5 Minuten 2 Proben aufgefangen (Abb. 2.5).

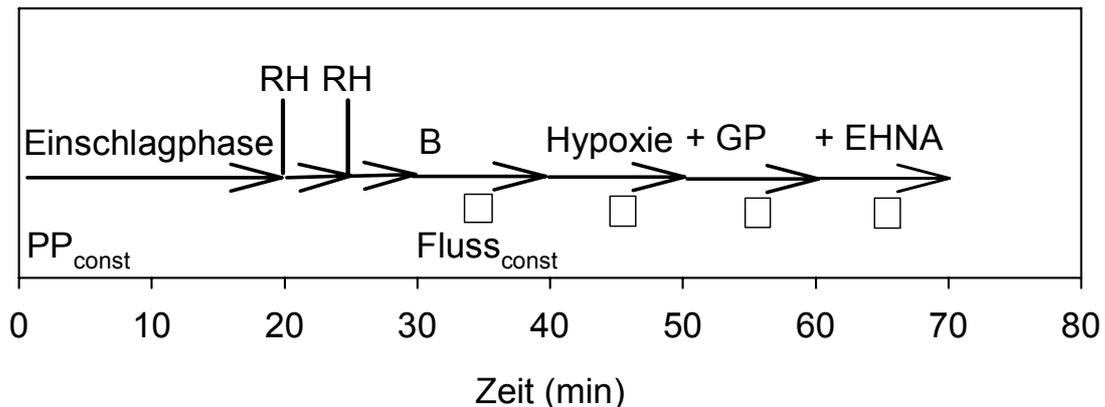


Abb. 2.5: GP 3521 0,1 $\mu\text{mol/l}$ und EHNA 5 $\mu\text{mol/l}$ in Hypoxie, **RH**=reaktive Hyperämie nach 20 Sekunden Ischämie (schwarze Balken), **B**=basale Purinfreisetzung in Normoxie, **GP**=GP 3521 in Hypoxie, \square =Probennahme, PP_{const} =druckkontrollierte Perfusion, $Fluss_{const}$ =flusskontrollierte Perfusion

2.3.1.4 Purinfreisetzung unter GP 3449 und EHNA

In einer weiteren Versuchsreihe ($n=7$) wurden GP 3449 und EHNA in Normoxie verwendet. Es wurden zu Beginn zwei zusätzliche Proben für die Bestimmung der basalen Purinfreisetzung abgenommen.

EHNA wurde in einer Endkonzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ über die gesamte Versuchsdauer infundiert. Fünf Minuten nach Beginn der Infusion mit EHNA wurden jeweils zwei Proben im Abstand von fünf Minuten abgenommen. Darauf wurde mit der zusätzlichen Infusion von GP 3449 in einer Endkonzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ begonnen und über den gesamten Versuchsverlauf aufrechterhalten. Es wurden in Abständen von fünf Minuten zu fünf festgesetzten Zeitpunkten jeweils 2 Proben abgenommen (Abb. 2.6).

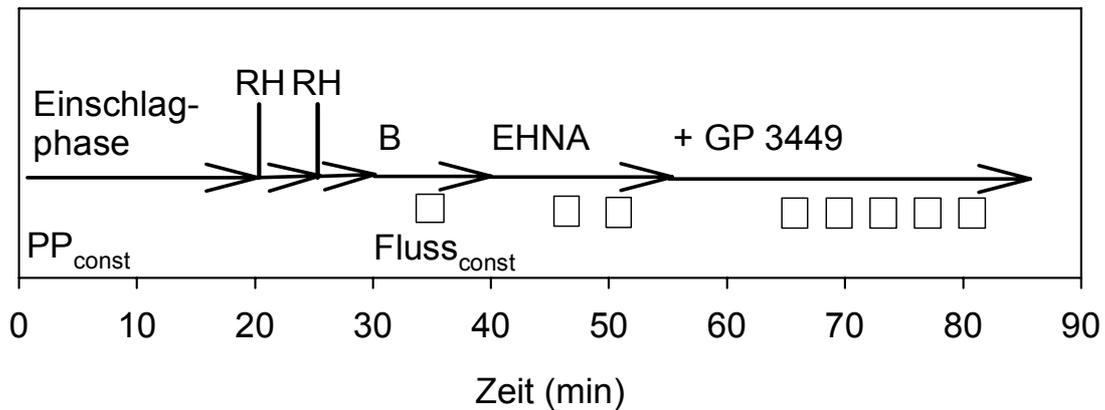


Abb. 2.6: GP 3449 10 $\mu\text{mol/l}$ und EHNA 5 $\mu\text{mol/l}$, **RH**=reaktive Hyperämie nach 20 Sekunden Ischämie (schwarze Balken), **B**=basale Purinfreisetzung in Normoxie, \square =Probennahme, **PP_{const}**=druckkontrollierte Perfusion, **Fluss_{const}**=flusskontrollierte Perfusion

2.3.1.5 Abschätzung der Umsatzrate der AMP-Desaminase unter Coformycin

Coformycin inhibiert sowohl die Adenosin-Desaminase als auch die AMP-Desaminase. In diesen Versuchen (n=6) wurde Coformycin in einer Endkonzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ infundiert. Es wurden zu drei definierten Zeitpunkten jeweils 2 Proben abgenommen (Abb. 2.7).

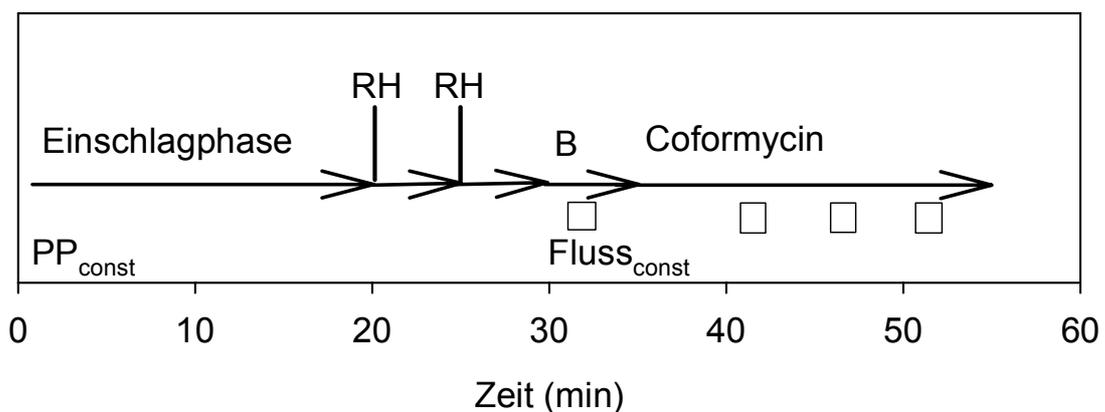


Abb. 2.7: Coformycin 10 $\mu\text{mol/l}$, **RH**=reaktive Hyperämie nach 20 Sekunden Ischämie (schwarze Balken), **B**=basale Purinfreisetzung in Normoxie, \square =Probennahme, **PP_{const}**=druckkontrollierte Perfusion, **Fluss_{const}**=flusskontrollierte Perfusion

2.3.2 Einfluss der Purin-de-novo-Synthese

Um den Einfluss der Purin-de-novo-Synthese über die Bildung von IMP auf die Purinfreisetzung zu untersuchen, wurden Meerschweinchenherzen wie unter 2.1.1 beschrieben in Normoxie perfundiert (n=5). Zunächst wurde EHNA in einer Endkonzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ appliziert und nach 5 Minuten 2 Proben gesammelt. Methotrexat wurde darauf in einer Endkonzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ infundiert und es wurden während der gesamten Versuchsdauer zu drei definierten Zeitpunkten jeweils 2 Proben abgenommen (Abb. 2.8).

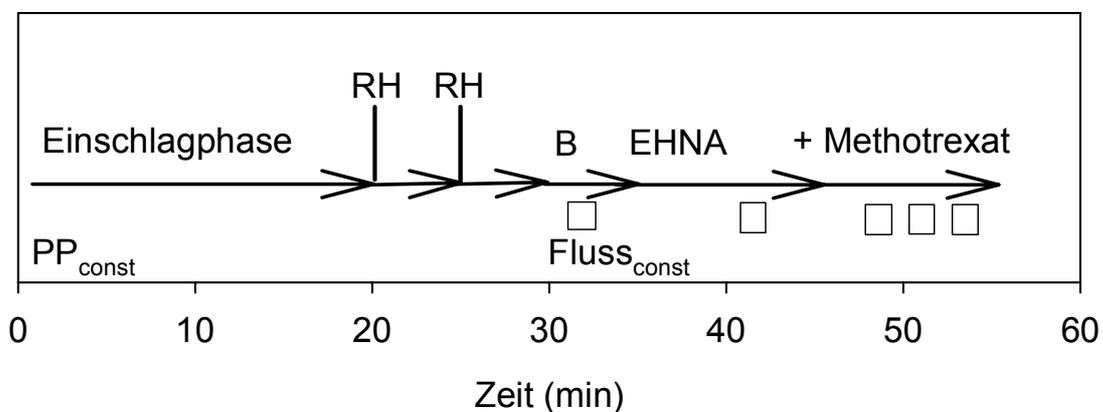


Abb. 2.8: EHNA 5 $\mu\text{mol/l}$ und Methotrexat 5 $\mu\text{mol/l}$, **RH**=reaktive Hyperämie nach 20 Sekunden Ischämie (schwarze Balken), **B**=basale Purinfreisetzung in Normoxie, \square =Probennahme, **PP_{const}**=druckkontrollierte Perfusion, **Fluss_{const}**=flusskontrollierte Perfusion

2.3.3 Hemmbarkeit der AMP-Desaminase im myokardialen Gewebeextrakt

In diesen Versuchen wurde die Effizienz der Inhibitoren Coformycin und GP 3521 untersucht. Wie unter 2.1.2 beschrieben wurde Herzgewebe mechanisch aufgeschlossen und die Proteine grob gereinigt. Das Gewebehomogenat wurde mit AMP als Substrat in unterschiedlichen Konzentrationen und dem jeweiligen Inhibitor inkubiert. Nach definierter Zeit wurde die Reaktion gestoppt, das Enzym gefällt, und mit der HPLC der AMP-, IMP- und Inosin-Gehalt gemessen.

Es wurden Testreihen mit 2.5, 0.25, 0.025 mmol/l AMP mit und ohne 1 $\mu\text{mol/l}$ GP 3521 (n=1) sowie mit Coformycin in den Konzentrationen 10, 1, 0.1, und 0.01 $\mu\text{mol/l}$ (n=3) gefahren. Die Testansätze mit Coformycin wurden über unterschiedliche Zeiträume inkubiert (0, 5, 15 Minuten). Danach wurden 100 μl pro Testansatz für die Analyse mit der HPLC entnommen.

2.3.4 *Myokardialer Nukleotid- und Nukleosidgehalt nach Ischämie*

In diesen Versuchen wurde der Einfluss von GP 3521 (n=6) und GP 3449 (n=7) auf den myokardialen Nukleotid- und Nukleosidgehalt nach Ischämie an Meerschweinchenherzen untersucht. Ischämie führt zur ATP-Depletion, konsekutiv steigt die AMP-Konzentration und es kommt zu einer Akkumulation von IMP.

In Normoxie soll GP 3521 die AMP-Desaminase inhibieren und somit die Bildung von IMP aus AMP reduzieren. In Ischämie ist eine reduzierte IMP-Konzentration durch eine effektive Blockade der AMP-Desaminase zu erwarten.

Es wurden Meerschweinchenherzen wie unter 2.1.1.1 beschrieben präpariert und über 15 Minuten mit normoxischem Krebs-Henseleit-Medium perfundiert. Nach dieser Phase wurden die Inhibitoren GP 3521 und GP 3449 über 15 Minuten infundiert. Anschließend erfolgte eine globale Ischämie für weitere 15 (GP 3521) und 20 Minuten (GP 3449). Bei den Kontrollversuchen schloss sich die Ischämiephase unmittelbar der Einschlagphase an. Am Versuchende wurden die Herzen direkt mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und für die weitere Aufarbeitung bei - 20° C gelagert.

In der ersten Versuchsreihe wurde der myokardiale AMP-, IMP- und Inosin-Gehalt nach 15 Minuten Ischämie gemessen. GP 3521 wurde zuvor in einer Endkonzentration von 1 µmol/l über 15 Minuten infundiert.

In der zweiten Versuchsreihe wurde der myokardiale ATP-, AMP-, IMP-, Adenosin- und Inosin-Gehalt nach 20 Minuten Ischämie gemessen. Die Meerschweinchenherzen wurden mit EHNA und GP 3449 vorbehandelt. Durch die Blockade der Adenosin-Desaminase mit EHNA ist zum einen ein Anstieg des Adenosin-Gehalts, zum anderen ein Abfall des Inosin-Gehalts zu erwarten. Durch die Blockade der AMP-Desaminase mit GP 3449 ist ein Anstieg des AMP-Gehalts sowie ein Abfall des IMP-Gehalts zu erwarten.

Für die Versuche mit GP 3449 wurde der Inhibitor in einer Endkonzentration von 10 µmol/l und EHNA in einer Endkonzentration von 5 µmol/l über 15 Minuten infundiert. Die globale Ischämie dauerte 20 Minuten.

2.3.5 *Zellpermeabilität von Kardiomyozyten*

Um zu testen, ob GP 3521 Kardiomyozytenmembranen permeiert, wurden adulte, Ca²⁺-sensitive Kardiomyozyten der Ratte wie unter 2.1.3 beschrieben isoliert, mit GP 3521 inkubiert und die zytosolische Konzentration mit der HPLC gemessen (n=6). Die Trennung

des zytosolischen Kompartiments vom Extrazellulärraum wurde mit Hilfe der Bromododekan-Zentrifugation (76) und eines Extrazellulärmarkers vorgenommen.

Nach Zugabe von 50 μM GP 3521 wurden Kardiomyozyten bei ständiger Begasung mit Carbogen für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde 100 μl ^{14}C -Carboxyl-Inulin (Inulin-Carboxyl, [Carboxyl- ^{14}C]; spez. Aktivität 0.077 GBq/g, Aktivität 1.05 GBq/200 μl H_2O) hinzugefügt, vorsichtig gemischt und Proben unterschiedlicher Volumina entnommen (1.2, 0.8, 0.4 ml).

Um die Zellen von dem sie umgebenden Medium zu trennen, wurde eine Bromododekan-Zentrifugation durchgeführt. In Eppendorf-Gefäßen wurden 800 μl 1-Bromododekan (Sigma) auf 50 μl 2 M Perchlorsäure aufgeschichtet und die Proben wiederum vorsichtig auf das Öl-Bromododekan aufgeschichtet und für 2 Minuten mit einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Nach der Zentrifugation waren im Gefäß vier Schichten zu unterscheiden. Die oberste Schicht bestand aus dem die Zellen umgebenden Medium. Schicht 2 war die klare Bromododekanschicht, die verworfen wurde. Schicht 3 enthielt die entproteinierte, zytosolische Fraktion der Kardiomyozyten und darunter befanden sich die Proteine als Pellet. Jeweils ein Aliquot der zytosolischen und der extrazellulären Fraktion wurde mit Szintillationscocktail versetzt und im Wallac 1400 DSA die Radioaktivität bestimmt. Ein weiteres Aliquot wurde für die HPLC-Bestimmung vom Inhibitor vorbereitet. Dafür wurde der zytosolische Extrakt mit 1 mol/l Na_2CO_3 neutralisiert und der Überstand nach Zentrifugation für die HPLC-Messung bei -70°C aufbewahrt. Für eine Proteinbestimmung wurde das Proteinpellet mit 1 mol/l NaOH aufgelöst und mit der Methode nach Lowry et al. (51) gemessen.

2.4 Analytische Methoden

2.4.1 Probenaufbereitung

2.4.1.1 Probenaufbereitung für die HPLC zur Bestimmung von Adenosin, Inosin, Hypoxanthin, Xanthin und Harnsäure

Die Effluatproben wurden sofort eisgekühlt und vor der weiteren Aufarbeitung abgewogen. Aus der Dauer der Probengewinnung (min), dem Probengewicht ($\text{g}=\text{ml}$) und dem Herzfeuchtgewicht (g) erfolgte die Bestimmung des koronaren Flusses in $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

Für die Bestimmung von Inosin, Hypoxanthin, Xanthin und Harnsäure wurden die Proben lyophilisiert. Um Adenosin und Inosin mit der HPLC zu messen wurden die Proben zunächst mittels Festphasenextraktion konzentriert.

Für die Bestimmung von Inosin, Hypoxanthin und Xanthin wurden aus dem gesamten Probenvolumen (15-20 ml) jeweils 10 ml tiefgefroren und dann lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde anschließend mit 1 ml H₂O resuspendiert und in Eppendorf-Gefäße überführt. Nach Zentrifugation über 30 Minuten bei 4°C und 14000 U/min wurden 150 µl des Überstands für die HPLC abgenommen.

Das restliche Probenvolumen wurde für die Bestimmung von Adenosin verwendet und auf SEP-PAK C-18 Säulen gegeben. Die Nucleoside waren im salzhaltigen Perfusionsmedium gelöst und mussten entsalzt und konzentriert werden. Die Säulen wurden mit 5 ml 60% Methanol vorbereitet und anschließend mit 2 ml Aqua dest. gespült. Nachdem die Säulen mit 2 ml 10 mmol/l KH₂PO₄-Puffer äquilibriert worden waren, wurden die Proben aufgegeben. Anschließend wurde das Salz durch Spülung mit 2 ml 10 mmol/l KH₂PO₄-Puffer eluiert und die Nucleoside mit 2 ml 60% Methanol ausgewaschen und in Auffanggläsern gesammelt. Zur weiteren Konzentrierung wurden die Proben dann in einem Evaporator eingedampft und anschließend mit 200 µl H₂O resuspendiert. Davon wurden 100 µl zur HPLC-Analyse eingesetzt (47).

2.4.1.2 Gewebeextraktion

Für die Gewebeextraktion wurden zwei Drittel des schockgefrorenen Herzgewebes in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser zerrieben. Das pulverisierte Gewebe wurde in eisgekühlte Reagenzgläser überführt, die zuvor mit 2 ml 1 M HClO₄ gefüllt worden waren, um vorhandene Proteine auszufällen. Das Gemisch wurde anschließend 10 Minuten bei 4000 U/min gekühlt zentrifugiert. 1.5 ml des Überstandes wurde in ein weiteres vorgekühltes Reagenzglas gegeben und mit 2 M K₃PO₄-Lösung neutralisiert. Das Proteinpellet am Boden des Reagenzglases wurde in 10 ml 1N NaOH für die Proteinbestimmung nach Lowry (51) gelöst. Der neutralisierte Überstand wurde wiederum 10 Minuten bei 4000 U/min gekühlt zentrifugiert, um das Neutralisationssalz zu separieren. Der Überstand wurde entnommen und für die weitere HPLC-Analyse bei -20 °C eingefroren. Auf diese Weise wurde verhindert, dass das Herzgewebe antaute und es zu weiteren Enzymreaktionen kam (16).

2.4.1.3 Probenaufbereitung der Kardiomyozyten

Es wurden unterschiedliche Volumina (1.2 ml, 0.8 ml, 0.4 ml) entnommen und auf vorbereitete Eppendorf-Gefäße gegeben. Alle Gefäße enthielten 800 µl Bromododekan und 50 µl 2 mol/l Perchlorsäure. Durch Bromododekan erfolgte die Trennung der Zellen von dem sie umgebenden Medium. Durch Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge, 2 Minuten) wurden die Proben in einen Überstand, der das extrazelluläre Volumen repräsentiert, eine klare Bromododekan-Schicht, einen zytosolischen Extrakt und ein Proteinpellet getrennt. 5 µl des Überstandes, sowie 5 µl und 10 µl des zytosolischen Extrakts (nach Zentrifugation) wurden mit jeweils 10 ml einer Szintillationslösung zur Messung der Radioaktivität versetzt. Durch Messung der Radioaktivität des Überstandes und des zytosolischen Extraktes konnte das extrazelluläre Volumen ermittelt werden. 200 µl des Überstandes und 40 µl zytosolischer Extrakt (+ 50 µl 1M Na₂CO₃) und 35 µl zytosolischer Extrakt (45 µl zytosolischer Extrakt + 50 µl 1 mol/l Na₂CO₃ - 10 µl für Radioaktivität) wurden für die weitere HPLC-Analyse aufbewahrt. Mit der HPLC wurde GP 3521 im Überstand und im zytosolischen Extrakt gemessen. Auf das Proteinpellet wurde 1 ml 1 mol/l NaOH für die Proteinbestimmung nach Lowry gegeben (76).

2.4.2 HPLC-Analyse

2.4.2.1 Bestimmung der Purine

Die Purine wurden mittels Reversed-Phase HPLC bestimmt. Das System bestand aus einer computergesteuerten HPLC-Anlage mit Niederdruckgradientensystem (Waters 600). Die Konzentrate wurden auf eine HPLC-Säule (3.9*150 mm, 10 µM, C-18 Bondapak von Waters) gegeben und mit einem Gradienten eluiert. Als Laufmittel wurden ein 25,95 mM Ammoniumacetat-Puffer (Puffer A: pH=5.0 mit 96% CH₃COOH) und ein Methanol-Wasser-Gemisch (Puffer B: MeOH : H₂O, 3:1) verwendet. Die Detektion für Adenosin und Inosin erfolgte mittels UV-Absorptionsmessung (Multiwavelength Detector 490e Waters) bei 254 nm. Das Injektionsvolumen betrug für Adenosin 100 µl. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Der Gradient wurde folgendermaßen programmiert:

Zeit in Minuten	%A	%B
0	95	5
9.3	95	5
9.6	65	35
10.8	0	100
16.0	0	100
25.0	95	5

Die Purine Inosin, Hypoxanthin, Xanthin und Harnsäure wurden auf eine längere HPLC Säule (3,9*300 mm, 10 µM, C-18 Bondapak von Waters) gegeben, um eine bessere Trennung zu erreichen. Die Detektion für Inosin, Hypoxanthin, Xanthin erfolgte bei 254 nm und für Harnsäure bei 290 nm mittels UV-Absorptionsmessung (Multiwavelength Detector 490e Waters). Das Injektionsvolumen betrug 150 µl. Der Gradient wurde folgendermaßen programmiert:

Zeit in Minuten	%A	%B
0	95	5
9.5	65	35
10.5	0	100
16	0	100
20	95	5
30	95	5

Über den Vergleich der Retentionszeiten der chromatographischen Peaks mit Standards wurden die Purine identifiziert und über die Integration der Peakflächen quantifiziert (47).

2.4.2.2 Bestimmung der Nukleotide

Die Nukleotide wurden über eine Reversed-Phase HPLC-Säule (Novapak Stahlsäule, C-18, 4 µM, 3.9*150 mm) aufgetrennt und in einem UV-Detektor bei 254 nm gemessen .

Der Gradient wurde mit Hilfe eines Kaliumdihydrogenphosphat-Tetrabutylammoniumhydrogensulfat-Gemisches (Puffer A: pH 5,4) und eines Methanol-Wasser-Gemisches (Puffer B: MeOH : H₂O, 70:30) über zwei Pumpen eingestellt. Der Gradient wurde folgenderweise eingestellt (16):

Zeit in Minuten	%A	%B
0	100	0
4	100	0
20	60	40
25	60	40
30	100	0
50	100	0

2.4.2.3 Bestimmung von GP 3521 in isolierten Kardiomyozyten

Der Gradient wurde über einen High-Pressure-Gradient mit einer NaH₂PO₄-Lösung (Puffer A: 10 mmol/l, pH 5.5) und einem Acetonitril-Puffer (Puffer B: 25% Acetonitril) gebildet. Die Detektion erfolgte bei 280 nm im UV-Detektor. Nachdem die Proben auf eine HPLC-Säule (RP18, 300*3.9, 4µm) gegeben wurden, erfolgte der Messlauf mit folgendem Gradienten (76):

Zeit in Minuten	%A	%B
0	100	0
5-12	0	100
25	100	0

2.5 Auswertung und Statistik

Die statistische Auswertung aller Daten erfolgte mit der Statistiksoftware SigmaStat[®] 3.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben und $p < 0,05$ als signifikant betrachtet. Die Anzahl der Versuche ist jeweils mit n angegeben. Sollten zwei Gruppen miteinander verglichen werden, wurde zunächst mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf einem Signifikanzniveau von 5% festgestellt, ob Abweichungen von der Normalverteilung vorliegen. War dies nicht der Fall, sind die Gruppen nach Feststellung der gleichen Varianz mit dem Student t-Test miteinander verglichen worden. Bei Abweichungen von der Normalverteilung wurden die Gruppen mit dem Mann-Whitney-Rangsummentest verglichen.

Sollten mehrere Gruppen miteinander verglichen werden, wurden die Mittelwerte der behandelten Gruppen einer einfachen Varianzanalyse (One way ANOVA) bei einem Signifikanzniveau $P = < 0,001$ unterzogen. Bei einem statistisch signifikanten Unterschied in den Mittelwerten, wurden multiple Vergleiche mit der jeweiligen Kontrollgruppe auf einem Signifikanzniveau von 5% nach der Holm-Sidak Methode durchgeführt (86).

3 Ergebnisse

Um die Bedeutung der AMP-Desaminase im kardialen Adenin-Nukleotid-Stoffwechsel zu charakterisieren, wurde die Umsatzrate des Enzyms im Meerschweinchenherzen mit zwei unterschiedlichen Ansätzen bestimmt. Wie Abbildung 3.1 zeigt, führt die Desaminierung von AMP zur Bildung von IMP. Dessen dephosphorylierten Abbauprodukte Inosin und Hypoxanthin können über die Zellmembran in den vaskulären Raum diffundieren, und aus dem Herz zusammen mit ihren Abbauprodukten Xanthin und Harnsäure (Urat) freigesetzt werden. Eine Bestimmung der Freisetzung von Inosin und Hypoxanthin ermöglicht somit einen Einblick in die Aktivität der AMP-Desaminase. Bei gleichzeitiger Blockade der Bildung von Inosin aus Adenosin (Adenosin-Desaminase) und des Abbaus von Hypoxanthin zu Xanthin (Xanthin-Oxidase) wäre die Inosin- und Hypoxanthin-Freisetzung im steady state (bei vernachlässigbarem Abbau von ITP zu IMP) ein direktes Maß für die AMP-Desaminierung. Dies setzt voraus, dass der Beitrag der Purin-de-novo-Synthese und der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) zur IMP-Bildung sehr gering ist.

Daher wurde in einem ersten Ansatz nicht nur die Inosin- und Hypoxanthin-Freisetzung unter Gabe von EHNA und Allopurinol bestimmt, sondern auch die Bedeutung der Purin-de-novo-Synthese abgeschätzt.

Eine direkte pharmakologische Hemmung der AMP-Desaminase sollte unmittelbar zu einer Reduktion der Inosin- und Hypoxanthin-Freisetzung führen. Bei konstanter Bildung von IMP aus den o.g. anderen Stoffwechselwegen wäre dann die Abnahme der Inosin- und Hypoxanthin-Freisetzung ein direktes Maß für die Umsatzrate der AMP-Desaminase. Dieser Ansatz wurde unter Einsatz unterschiedlicher Inhibitoren (Coformycin, GP 3521, GP 3449) verfolgt.

Es werden im folgenden die Befunde 1) der gleichzeitigen Hemmung der Adenosin-Desaminase und der Xanthin-Oxidase zur Abschätzung der Umsatzrate der AMP-Desaminase und ein möglicher Einfluss der Purin-de-novo-Synthese auf die IMP-Bildung und 2) der spezifischen Inhibition der AMP-Desaminase dargestellt.

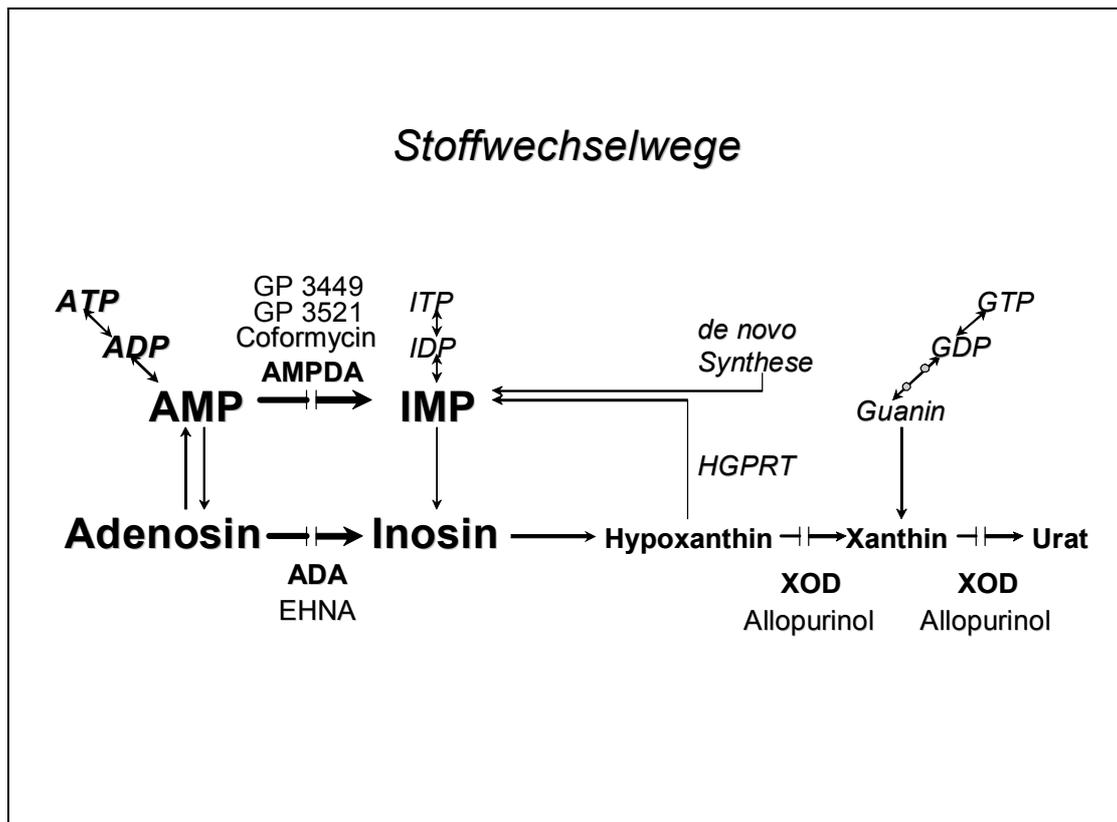


Abb. 3.1: ADA: Adenosin-Desaminase, AMPDA: AMP-Desaminase, XOD: Xanthin-Oxidase, HGPRT: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase

3.1 Inosin- und Hypoxanthin-Freisetzung in Normoxie und Hypoxie zur Bestimmung der Umsatzrate der AMP-Desaminase

Es wurden die Freisetzungsraten von Adenosin, Inosin, Hypoxanthin, Xanthin und Harnsäure im koronarvenösen Effluat gemessen. Die Adenosin-Desaminase wurde mit 5 $\mu\text{mol/l}$ EHNA und die Xanthin-Oxidase mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Allopurinol gehemmt. Die Versuche erfolgten in Normoxie (95% O_2) und moderater Hypoxie (40% O_2).

Abb. 3.2A zeigt das Profil der basalen koronarvenösen Purinfreisetzung und die Freisetzungsraten der Metabolite in Normoxie (95% O_2). Die basale Adenosin-Freisetzungsrates ($167 \pm 126 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) ist wesentlich niedriger als die des Inosins und seiner Abbauprodukte. Die Freisetzungsraten von Inosin ($1266 \pm 568 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) und Hypoxanthin ($559 \pm 228 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) haben zusammen den größten Anteil an der Purinkatabolitfreisetzungsrates. Die basale Xanthin-Freisetzungsrates ist im Vergleich zu den übrigen Purinen und deren Metaboliten gering ($252 \pm 115 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$). Die Freisetzungsrates der Harnsäure ist dagegen am größten ($1648 \pm 537 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$).

In Abb. 3.2B fällt vor allem auf, dass nach Inhibition der Adenosin-Desaminase und der Xanthin-Oxidase durch EHNA und Allopurinol die Freisetzungsraten von Inosin und Hypoxanthin im Vergleich zu den basalen Freisetzungsraten konstant blieben. Da bei Hemmung der Adenosin-Desaminase und der Xanthin-Oxidase die Freisetzungsraten von Inosin und Hypoxanthin ein direktes Maß für die Aktivität der AMP-Desaminase darstellen, kann die Umsatzrate der AMP-Desaminase mit $1820 \pm 294 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ als Summe der Freisetzungsraten von Inosin ($1186 \pm 46 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) und Hypoxanthin ($668 \pm 54 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) abgeschätzt werden. Durch Inhibition der Adenosin-Desaminase nahm die Freisetzungsrate von Adenosin erwartungsgemäß auf das doppelte zu. Nach Blockade der Xanthin-Oxidase mit Allopurinol blieb die Xanthin-Freisetzungsrate konstant, die Harnsäure-Freisetzungsrate nahm auf 1/5 des basalen Wertes ab.

In Abb. 3.2C sind die Purinfreisetzungsraten bei Blockade der Adenosin-Desaminase und Xanthin-Oxidase unter der Bedingung einer moderaten Hypoxie dargestellt. Unter diesen Bedingungen sind Inosin mit einem 3.6-fachen Anstieg der Freisetzungsrates und Hypoxanthin mit einem 3.5-fachen Anstieg der Freisetzungsrates die bei weitem dominierenden Abbauprodukte des Adenin-Nukleotid-Stoffwechsels. Wie erwartet wurde ein Anstieg der Freisetzungsrates von Adenosin um das 15-fache festgestellt. Die Freisetzungsrates der Abbauprodukte Xanthin und Harnsäure blieben durch die Blockade der Xanthin-Oxidase gering.

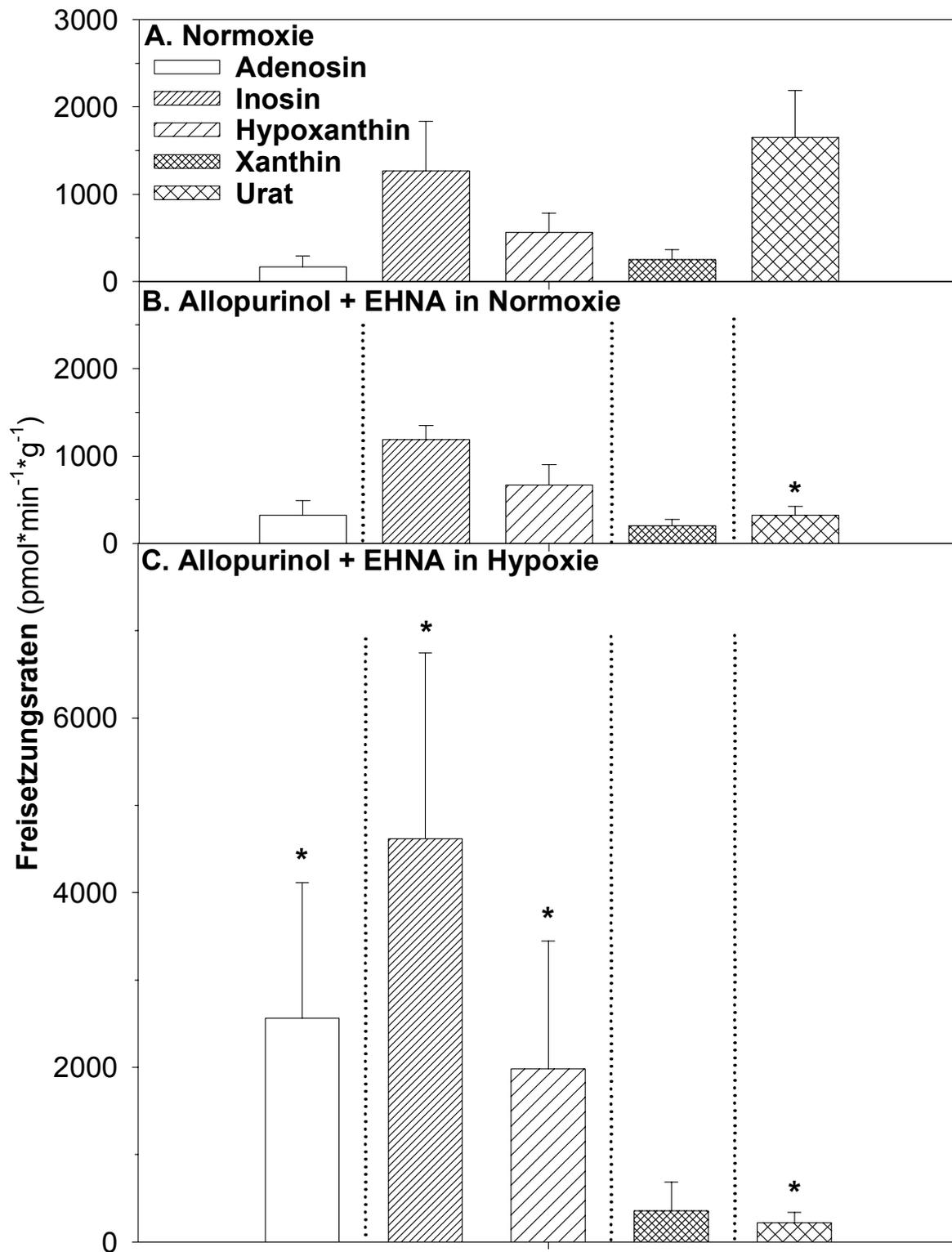


Abb. 3.2A-C: Freisetzungsprofil der koronarvenösen Purine und ihrer Abbauprodukte am Meerschweinchenherzen in **A.** Normoxie ($n=6$), **B.** in Normoxie unter $10 \mu\text{mol/l}$ Allopurinol und $5 \mu\text{mol/l}$ EHNA ($n=6$) und **C.** in Hypoxie ($n=6$). Adenosin wird durch die ADA zu Inosin und Hypoxanthin metabolisiert, Hypoxanthin wird über die XOD zu Xanthin und weiter zu Harnsäure abgebaut, die gestrichelten Linien stellen die durch die ADA und XOD katalysierten Reaktionen dar (*: $p < 0,05$ im Vergleich zu Kontroll-Normoxie).

In Abb. 3.3 sind die Summen der Inosin- und Hypoxanthin-Freisetzungsraten in Normoxie und Hypoxie bei Blockade der Adenosin-Desaminase und Xanthin-Oxidase zusammengefasst. Es ist ein 3.5-facher Anstieg der Gesamtfreisetzungsrates von Inosin und Hypoxanthin in Hypoxie zu erkennen. Da Inosin und Hypoxanthin als Maß für die Aktivität der AMP-Desaminase dienen, lässt sich hier die Umsatzrate der AMP-Desaminase in Normoxie mit $1820 \pm 294 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ und in Hypoxie mit $6960 \pm 2634 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ abschätzen.

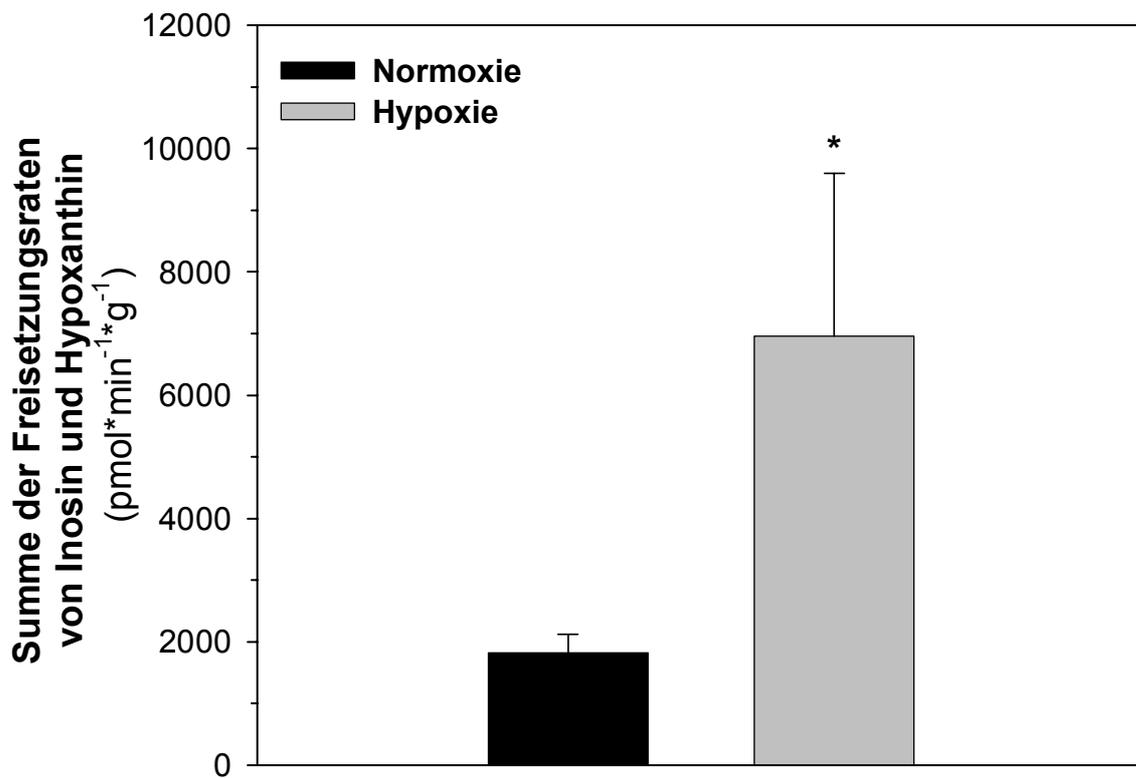


Abb. 3.3: Summe der Inosin- und Hypoxanthin-Freisetzungsraten in Normoxie und Hypoxie bei Hemmung der ADA und XOD mit EHNA und Allopurinol (n=6, *: p<0,05 Hypoxie vs. Normoxie).

3.2 Bedeutung der Purin-de-novo-Synthese

IMP dient in der Purin-de-novo-Synthese als Vorstufe von AMP und GMP. Eine Abschätzung der Umsatzrate der AMP-Desaminase über Inosin und Hypoxanthin, die Metabolite von IMP sind, setzt daher einen geringen Einfluss der Purin-de-novo-Synthese voraus und es sollte dann bei gleichzeitiger Hemmung der Adenosin-Desaminase und der Dihydrofolatreduktase keine signifikante Änderung der Inosin- und Hypoxanthin-Freisetzungsraten zu sehen sein. Methotrexat hemmt die Dihydrofolatreduktase, wodurch Tetrahydrofolsäure für die Purin-de-novo-Synthese nicht mehr zur Verfügung steht.

Um den Einfluss der Purin-de-novo-Synthese auf die Freisetzungsraten von Inosin und Hypoxanthin bestimmen zu können, wurde in diesen Versuchen (n=5) Methotrexat in einer Endkonzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ und EHNA in einer Endkonzentration von ebenfalls 5 $\mu\text{mol/l}$ infundiert.

Abbildung 3.4A zeigt die basale Freisetzungsraten der Purine und ihrer Metabolite. Nach Infusion von EHNA stieg die Freisetzungsraten von Adenosin von $21 \pm 19 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ auf $29 \pm 24 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ und die Freisetzungsraten von Inosin fiel von $360 \pm 259 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ auf $232 \pm 203 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ (Abb. 3.4B). Insgesamt nahmen auch die Freisetzungsraten der Purinkatabolite nach Infusion von EHNA ab.

Abbildung 3.4C zeigt, dass die zusätzliche Infusion von Methotrexat zu keiner weiteren Veränderung der Freisetzungsraten von Inosin und seiner Metabolite führte. Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass eine Hemmung der Purin-de-novo-Synthese keinen Einfluss auf die Freisetzung von Inosin und seiner Abbauprodukte hat und bei gleichzeitiger Hemmung der Adenosin-Desaminase der Beitrag der Purin-de-novo-Synthese zur IMP-Bildung sehr gering ist. Damit lässt sich abschließend feststellen, dass die Purin-de-novo-Synthese verglichen mit der Umsatzrate der AMP-Desaminase gering ist, und dementsprechend für die Abschätzung der AMP-Desaminase-Umsatzrate nicht berücksichtigt werden muss.

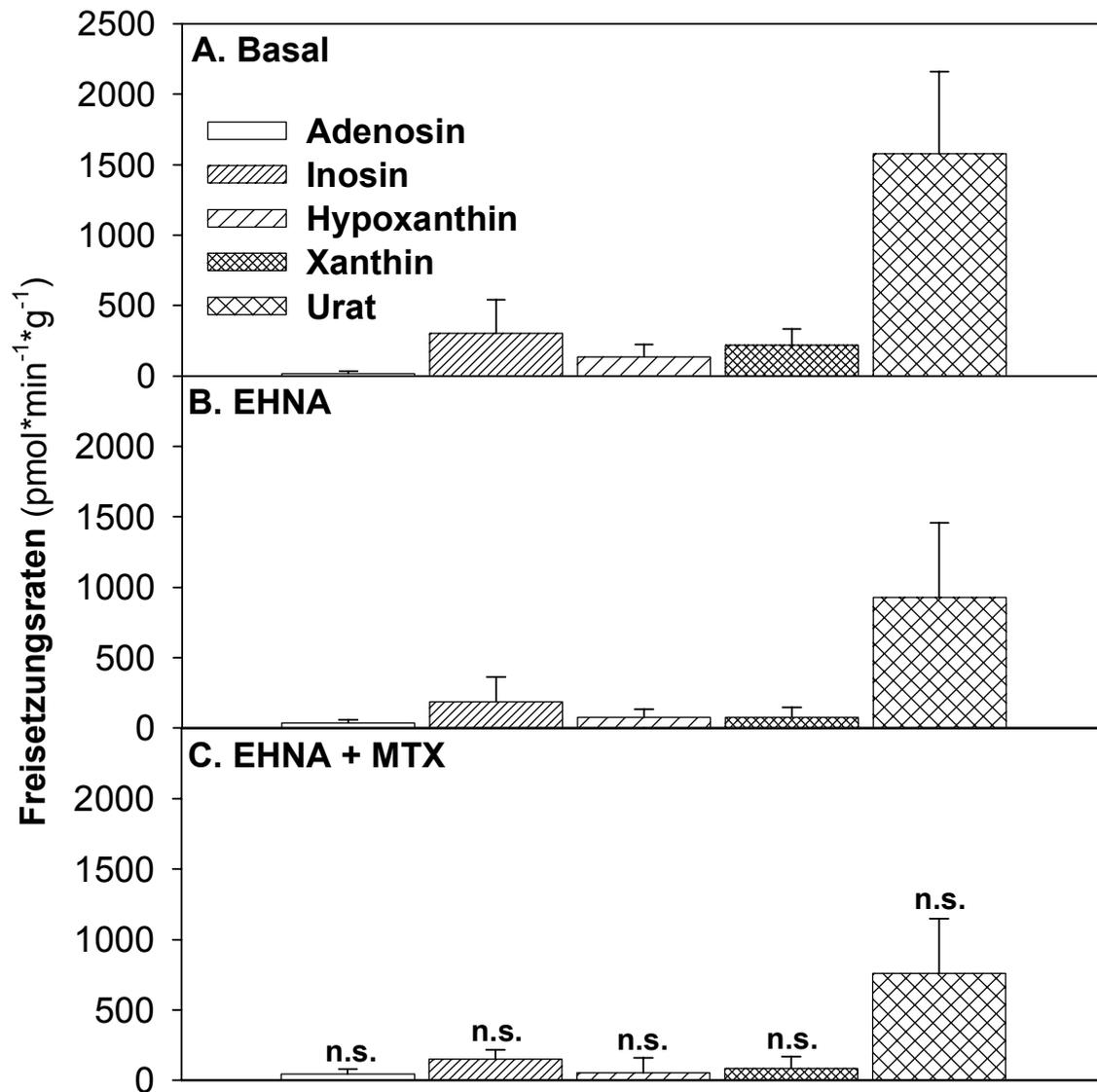


Abb. 3.4A-C: Freisetzungsraten ($\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) von Adenosin, Inosin, Hypoxanthin, Xanthin und Urat in **A.** Normoxie ($n=5$), **B** unter $5 \mu\text{mol/l}$ EHNA ($n=5$) und **C.** unter $5 \mu\text{mol/l}$ Methotrexat (MTX, nach 30 Min. Infusionsdauer) und $5 \mu\text{mol/l}$ EHNA ($n=5$, EHNA + MTX vs. EHNA, n.s.: nicht signifikant).

3.3 Direkte Inhibition der AMP-Desaminase zur Bestimmung der Umsatzrate

3.3.1 Effizienz der Inhibitoren

Die Wirksamkeit der eingesetzten Inhibitoren Coformycin, GP 3521 und GP 3449 wurde zunächst *in vitro* im myokardialen Extrakt getestet. Auf dieser Ebene wurde nach Aufbrechen der Zellmembranen ein direkter Angriff der Inhibitoren auf Enzymebene ermöglicht.

3.3.1.1 AMP-Desaminase-Kinetik unter Coformycin

Coformycin wurde in unterschiedlichen Konzentrationen zum myokardialen Enzymextrakt gegeben. AMP wurde als Substrat [S] mit aufsteigenden Konzentrationen (0.025, 0.25 und 2.5 mM) zum myokardialen Extrakt gegeben und nach definierter Reaktionszeit die IMP-Konzentration gemessen. Daraus ergab sich die Umsatzrate (V) der AMP-Desaminase. In Abb. 3.5 sind die reziproken Werte der Substratkonzentration $[1/S]$ auf der Abszisse und der Umsatzrate $[1/(\mu\text{M}/\text{min})]$ auf der Ordinate im Lineweaver-Burk-Diagramm dargestellt. Damit lässt sich die Kinetik der AMP-Desaminase in Gegenwart von Coformycin bei unterschiedlichen Konzentrationen beschreiben. Bei niedrigen Substratkonzentrationen ist die Umsatzrate der AMP-Desaminase stark von der Konzentration des Inhibitors abhängig. Dagegen ist bei höheren AMP-Konzentrationen die Umsatzrate nahezu unabhängig von der Coformycin-Konzentration. Coformycin hat also bei hohen AMP-Konzentrationen nahezu keinen Effekt mehr. Bei kompetitiver Hemmung der AMP-Desaminase durch steigende Konzentrationen von Coformycin wird die gleiche Umsatzrate erst bei viel höheren Substratkonzentrationen erreicht. Dadurch wird auch die Michaelis-Konstante (K_M) erhöht. Die Michaelis-Konstante gibt diejenige Substratkonzentration an, bei der eine Reaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft. K_M^{-1} lässt sich im Lineweaver-Burk-Diagramm anhand des Abszissenabschnitts ablesen. Bei steigenden Coformycin-Konzentrationen wird der negative Abszissenabschnitt kleiner, K_M wird also erhöht. Es wird aus Abb. 3.5 ersichtlich, dass Coformycin schon bei einer Konzentration von 1 μM zu einer signifikanten Hemmung der AMP-Desaminase führt, wobei die hier verwendeten AMP-Konzentrationen weit über den *in vivo* gemessenen liegen. Das bedeutet gemäß den obigen Ausführungen, dass schon bei z.B. 1 $\mu\text{mol/l}$ Coformycin-Konzentrationen die Umsatzrate der AMP-Desaminase *in vivo* sehr gering sein dürfte.

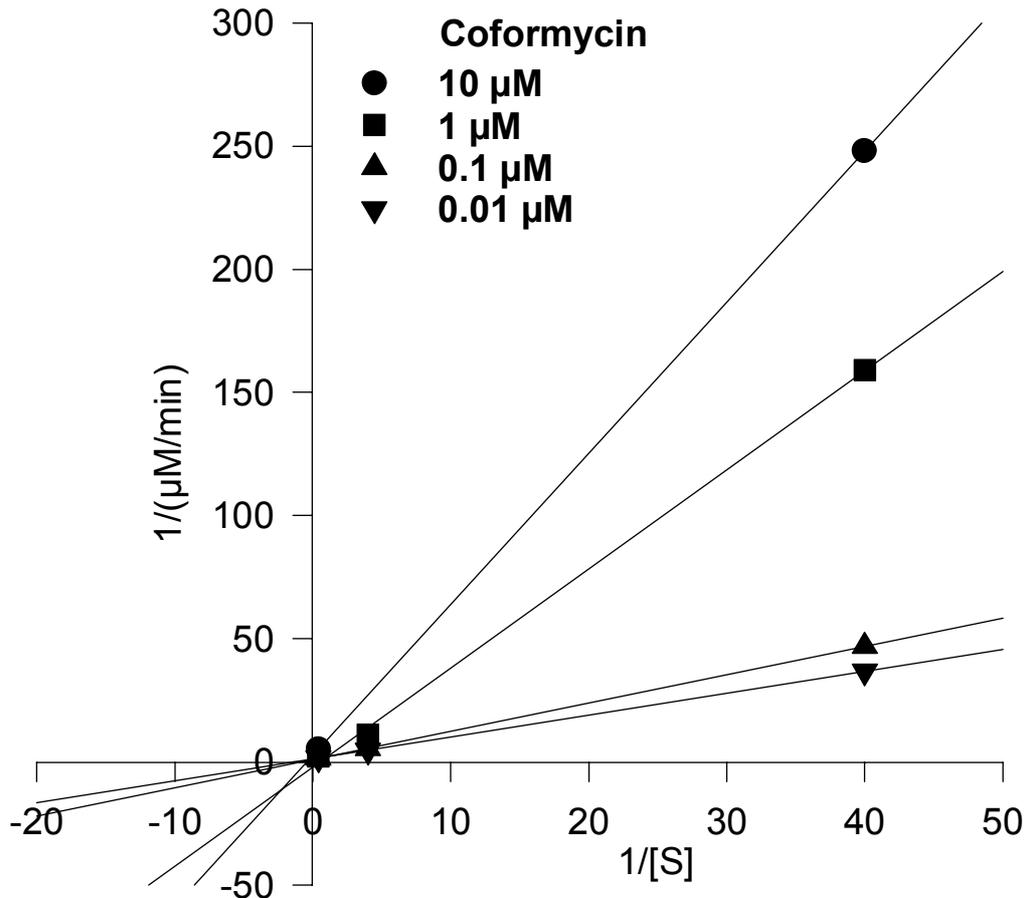


Abb. 3.5: Kinetik der AMP-Desaminase bei unterschiedlichen Konzentrationen von Coformycin. ($V_{\max}=192 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ bei $0.01 \text{ } \mu\text{mol/l}$ Coformycin, $K_M=1 \text{ mM}$), K_i von Coformycin= $1 \text{ } \mu\text{M}$. Es ergab sich kein Unterschied im K_i bei Inkubation der AMPD für 0, 5 und 15 min mit Coformycin. Die eingesetzten Konzentrationen von AMP waren 0.025, 0.25 und 2.5 mmol/l ($n=3$).

3.3.1.2 Hemmung der isolierten AMP-Desaminase durch GP 3521

In diesem Versuch ($n=1$) wurde die Aktivität der AMP-Desaminase im myokardialen Extrakt von Meerschweinchenherzen mit und ohne den AMP-Desaminase-Inhibitor GP 3521 bestimmt.

Es wurde nach Inkubation des Extrakts mit $1 \mu\text{mol/l}$ GP 3521 und unterschiedlichen Substratkonzentrationen von AMP (0.025, 0.25 mmol/l) der Abbau von AMP und die Bildung von IMP und Inosin gemessen. AMP wird entweder durch die 5'-Nukleotidase zu Adenosin, oder durch die AMP-Desaminase zu IMP und dann über die IMP-spezifische 5'-Nukleotidase zu Inosin abgebaut. Bei vollständiger Hemmung der AMP-Desaminase durch GP 3521 ist also nur eine partielle Hemmung des AMP-Abbaus zu erwarten. Bei zusätzlicher Inhibition der Adenosin-Desaminase durch EHNA ist die Desaminierung von AMP die einzige Quelle für

IMP und Inosin. Abb. 3.6 zeigt eine fast vollständige Unterdrückung der Inosin-Bildung bei Hemmung der AMP-Desaminase durch GP 3521. Unabhängig von der Substratkonzentration hemmt GP 3521 den Abbau von AMP um jeweils 50%.

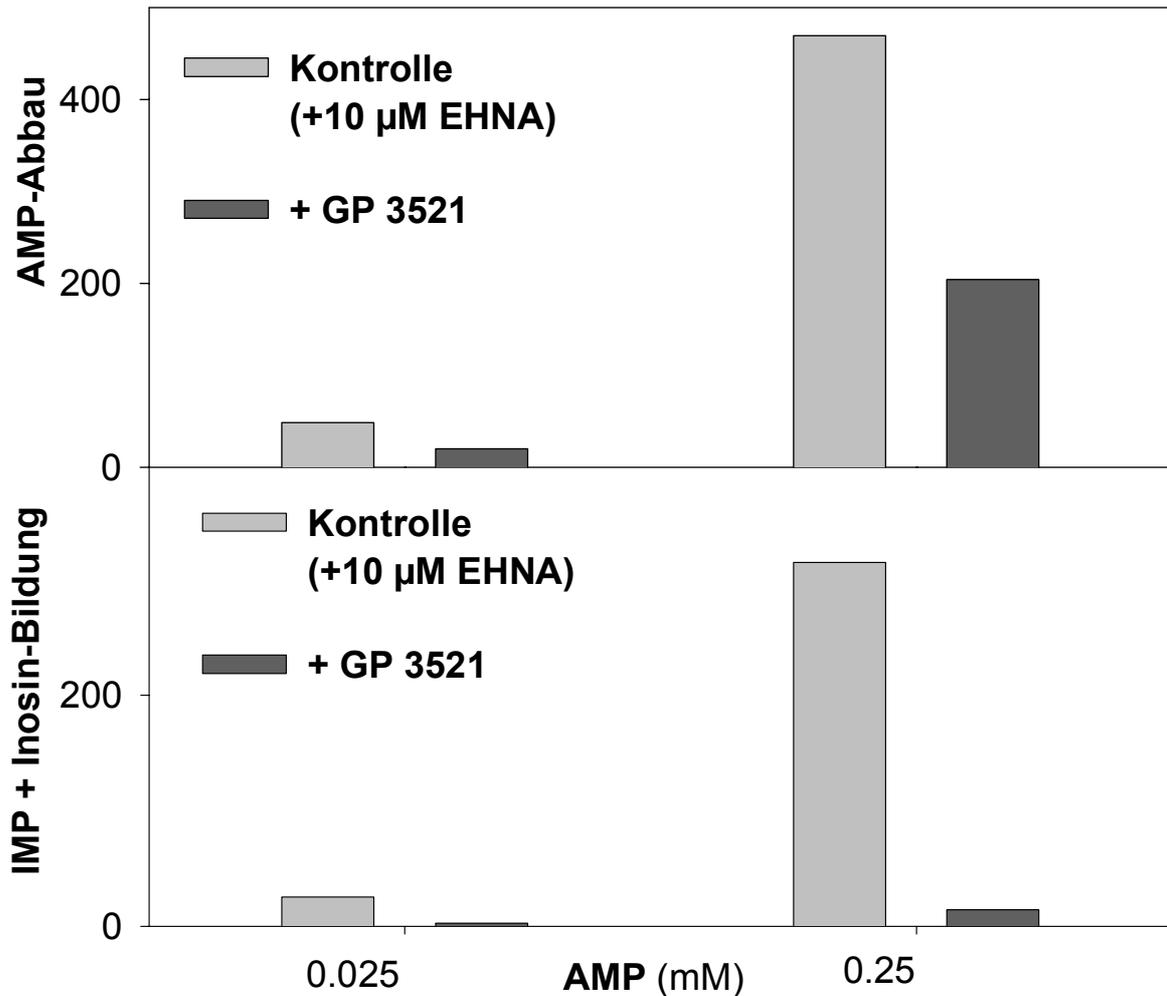


Abb. 3.6: Hemmung der AMPD im zytosolischen Extrakt von Meerschweinchenherzen durch 1 µM GP 3521 (n=1). Die Abnahme des AMP-Abbaus und der IMP- und Inosin-Bildung (nmol/min · g HFG) geben die Umsatzrate der AMPD wider. Die Herzen wurden einer 15-minütigen globalen Ischämie ausgesetzt.

In Abb. 3.7 ist die Hemmung der AMP-Desaminase mit und ohne den Inhibitor GP 3521 (1 µM) im Lineweaver-Burk-Diagramm dargestellt. Es ist das charakteristische Bild einer

kompetitiven Hemmung zu sehen. GP 3521 führt bei einer Konzentration von 1 μM zu einer signifikanten Hemmung der AMP-Desaminase.

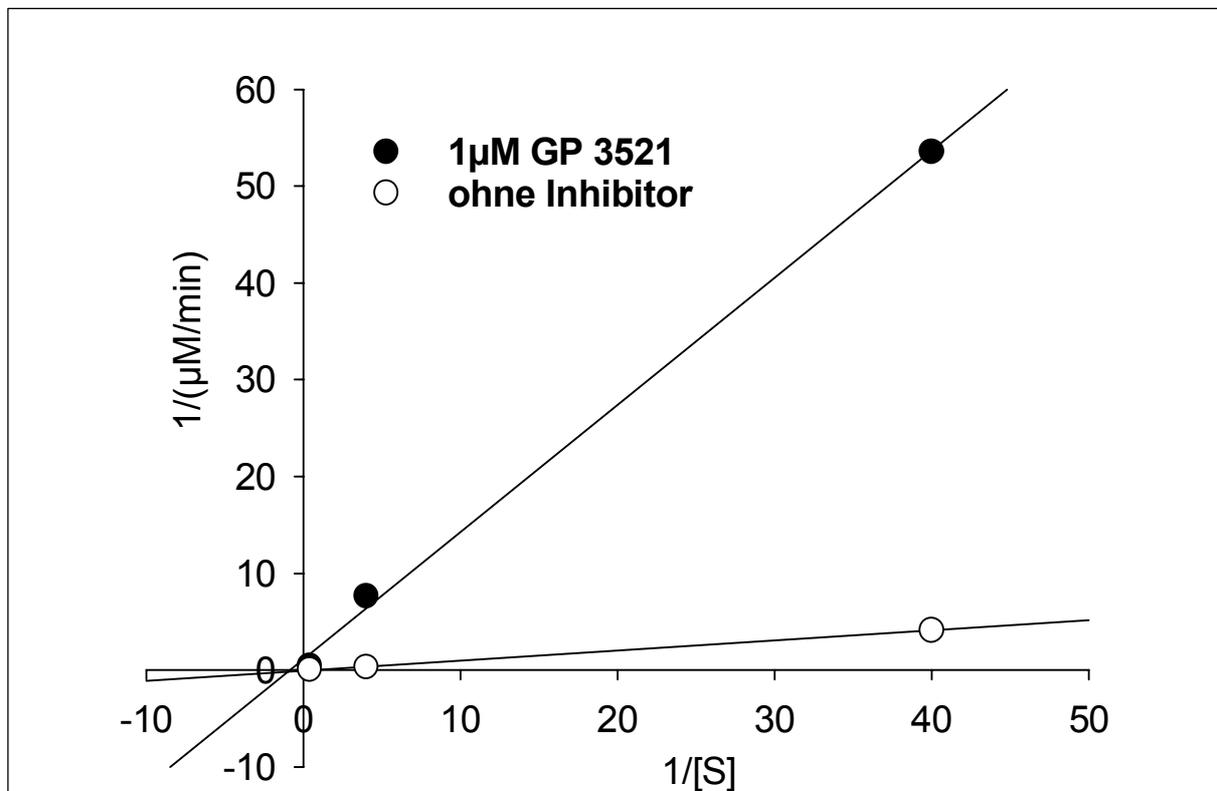


Abb. 3.7: Lineweaver-Burk-Diagramm. Hemmung der AMP-Desaminase mit 1 μM GP 3521 im myokardialen Enzymextrakt ($n=1$). AMP [S] wurde in den Konzentrationen 0.025, 0.25 und 2.5 mM eingesetzt. Die Umsatzrate ($\mu\text{M}/\text{min}$) der AMP-Desaminase wurde aus der IMP-Bildung berechnet.

3.3.2 Effekte von Coformycin und GP 3521 auf die Purinfreisetzung

3.3.2.1 Purinfreisetzung in Normoxie unter Coformycin

Es sollten hier die quantitativen Effekte der Hemmung der AMP-Desaminase anhand der Purinfreisetzung untersucht werden, um so bestimmen zu können, wie groß der Einfluss der AMP-Desaminase im Adenin-Nukleotid-Stoffwechsel ist ($n=6$). Coformycin hemmt sowohl die AMP-Desaminase als auch die Adenosin-Desaminase.

Abb. 3.8 zeigt, dass die Freisetzungsrates von Adenosin nach Infusion von 10 $\mu\text{mol}/\text{l}$ Coformycin auf das doppelte von $34 \pm 31 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ auf $60 \pm 88 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ansteigt. Die Freisetzungsrates von Inosin nehmen von $634 \pm 457 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ auf $367 \pm 201 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ und bei Hypoxanthin von $171 \pm 121 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ auf 122 ± 80

pmol · min⁻¹ · g⁻¹ nur geringfügig ab. Die Freisetzungsrates von Xanthin nimmt von 116 ± 67 pmol · min⁻¹ · g⁻¹ auf 84 ± 77 pmol · min⁻¹ · g⁻¹ und die Freisetzungsrates von Harnsäure von 1649 ± 607 pmol · min⁻¹ · g⁻¹ auf 1321 ± 586 pmol · min⁻¹ · g⁻¹ ab. Die Summe der Freisetzungsrates von Inosin, Hypoxanthin, Xanthin und Harnsäure lag in Normoxie bei 2885 ± 607 pmol · min⁻¹ · g⁻¹ und nahm nach Gabe von Coformycin zunächst auf 2085 ± 487 pmol · min⁻¹ · g⁻¹ ab. Da Coformycin keinen signifikanten Einfluss auf die Freisetzungsrates von Inosin und Hypoxanthin hatte, lässt sich in den hier durchgeführten Versuchen eine Hemmung der AMP-Desaminase nicht nachweisen. Später durchgeführte Versuche (s. Abb. 3.10, S. 53) zeigten zudem, dass die Freisetzung von Adenosin und Inosin über die Zeit nicht konstant bleibt, sondern kontinuierlich abnimmt. Auch dies könnte zu dem hier beobachteten Trend beigetragen haben. In diesen Versuchen nimmt im weiteren Verlauf die Gesamtfreisetzungsrates auf 1626 ± 557 pmol · min⁻¹ · g⁻¹ ab, also auf 56% der Gesamtfreisetzungsrates vor Gabe von Coformycin. Ein Zeiteffekt lässt sich aber nicht ausschließen.

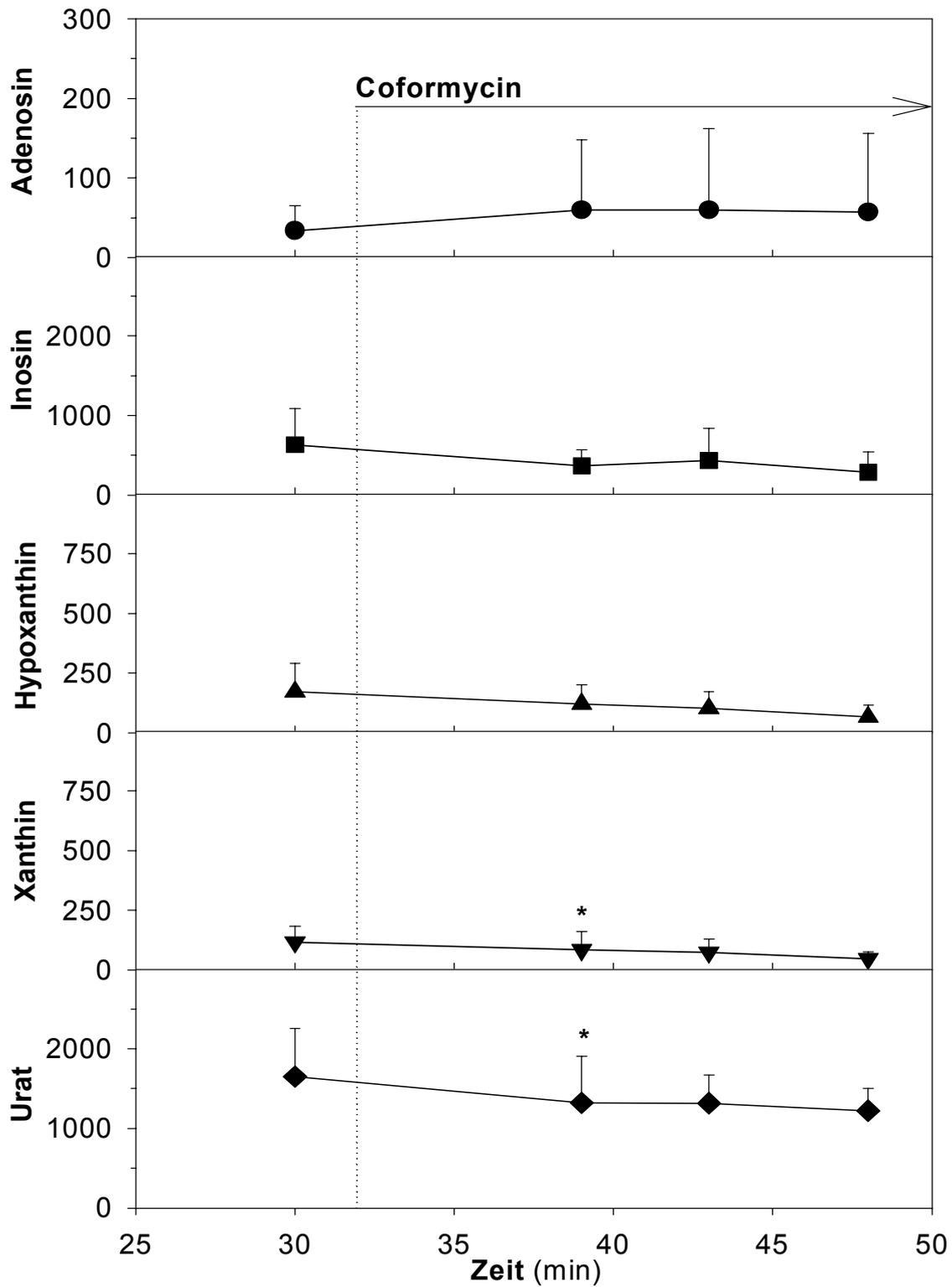


Abb. 3.8: Freisetzungsraten ($\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) von Adenosin, Inosin, Hypoxanthin, Xanthin und Urat in Normoxie unter $10 \mu\text{mol/l}$ Coformycin ($n=6$, *: $p<0,05$ im Vergleich zum Basalwert).

3.3.2.2 Purinfreisetzung unter GP 3521

In den folgenden Versuchen (n=4) wurde die Wirkung des AMPD-Inhibitors GP 3521 auf die koronarvenöse Purinfreisetzung untersucht. Der Inhibitor wurde in aufsteigenden Konzentrationen (0.01, 0.1, 1 und 5 $\mu\text{mol/l}$) zu definierten Zeitpunkten infundiert. Anschließend erfolgte eine Bestimmung der koronarvenösen Purinfreisetzung bei gleichzeitiger Applikation von EHNA (5 $\mu\text{mol/l}$) zur Hemmung der Adenosin-Desaminase und von GP 3521 in einer Endkonzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$.

Bei effektiver Blockade der AMP-Desaminase durch GP 3521 ist ein Abfall der Freisetzungsraten von Inosin und seiner nachfolgenden Metaboliten zu erwarten. Die zusätzliche Blockade der Adenosin-Desaminase durch EHNA sollte zu einem Anstieg der Adenosin-Freisetzungsraten führen.

Überraschenderweise wurde schon bei einer Konzentration von 0.01 $\mu\text{mol/l}$ GP 3521 eine deutliche Abnahme der Freisetzungsraten aller Purine beobachtet. Dies galt auch für die Freisetzungsraten von Adenosin, obwohl bei alleiniger Inhibition der AMP-Desaminase kein Abfall der Adenosin-Freisetzungsraten zu erwarten wäre (Abb. 3.9). Eine weitere Steigerung der Konzentration von GP 3521 führte zu keinem weiteren substantiellen Abfall der Freisetzungsraten.

Bei zusätzlicher Infusion von 5 $\mu\text{mol/l}$ EHNA wurde erwartungsgemäß durch die Blockade der Adenosin-Desaminase eine gering erhöhte Adenosin-Freisetzungsraten bei ausbleibendem Effekt auf die Freisetzungsraten der anderen Purine beobachtet.

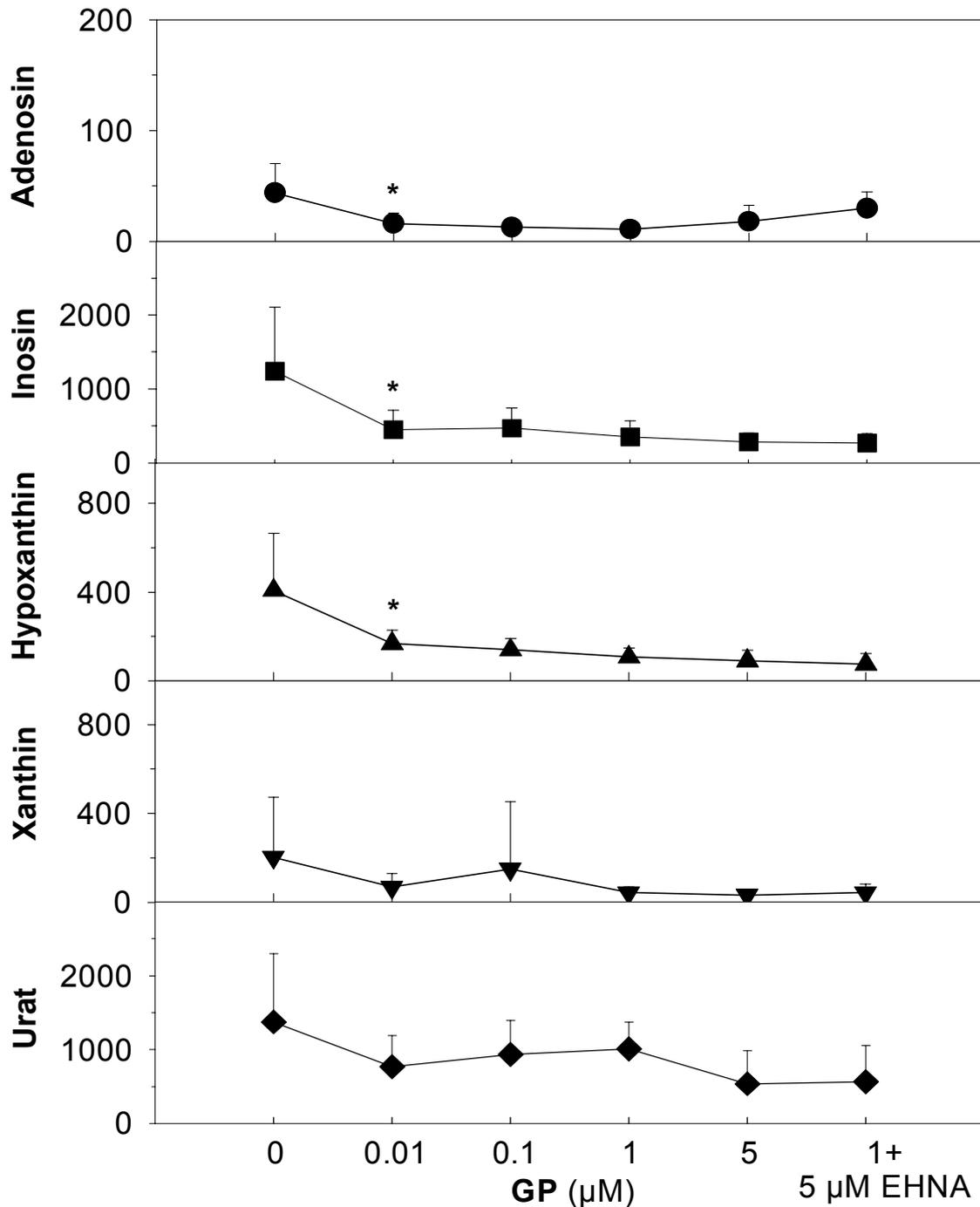


Abb. 3.9: Freisetzungsraten ($\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) von Adenosin, Inosin, Hypoxanthin, Xanthin und Urat unter steigenden Konzentrationen von GP 3521 ($n=4$, *: $p < 0,05$ im Vergleich zum Basalwert). Am Ende wurde zusätzlich $5 \mu\text{mol/l}$ EHNA infundiert.

Auf Grund der o.g. überraschenden scheinbaren Effektivität schon niedrigster Konzentrationen von GP 3521 wurden Kontrollversuche ($n=4$) mit Probennahme zu den gleichen Zeitpunkten durchgeführt. Stellt man die Ergebnisse dieser Zeitkontrolle den zuvor

gezeigten Daten gegenüber, so zeigt sich, dass die zuvor beschriebene Abnahme der Freisetzungsraten von Adenosin und Inosin allein auf den Zeitverlauf zurückzuführen war (Abb. 3.10).

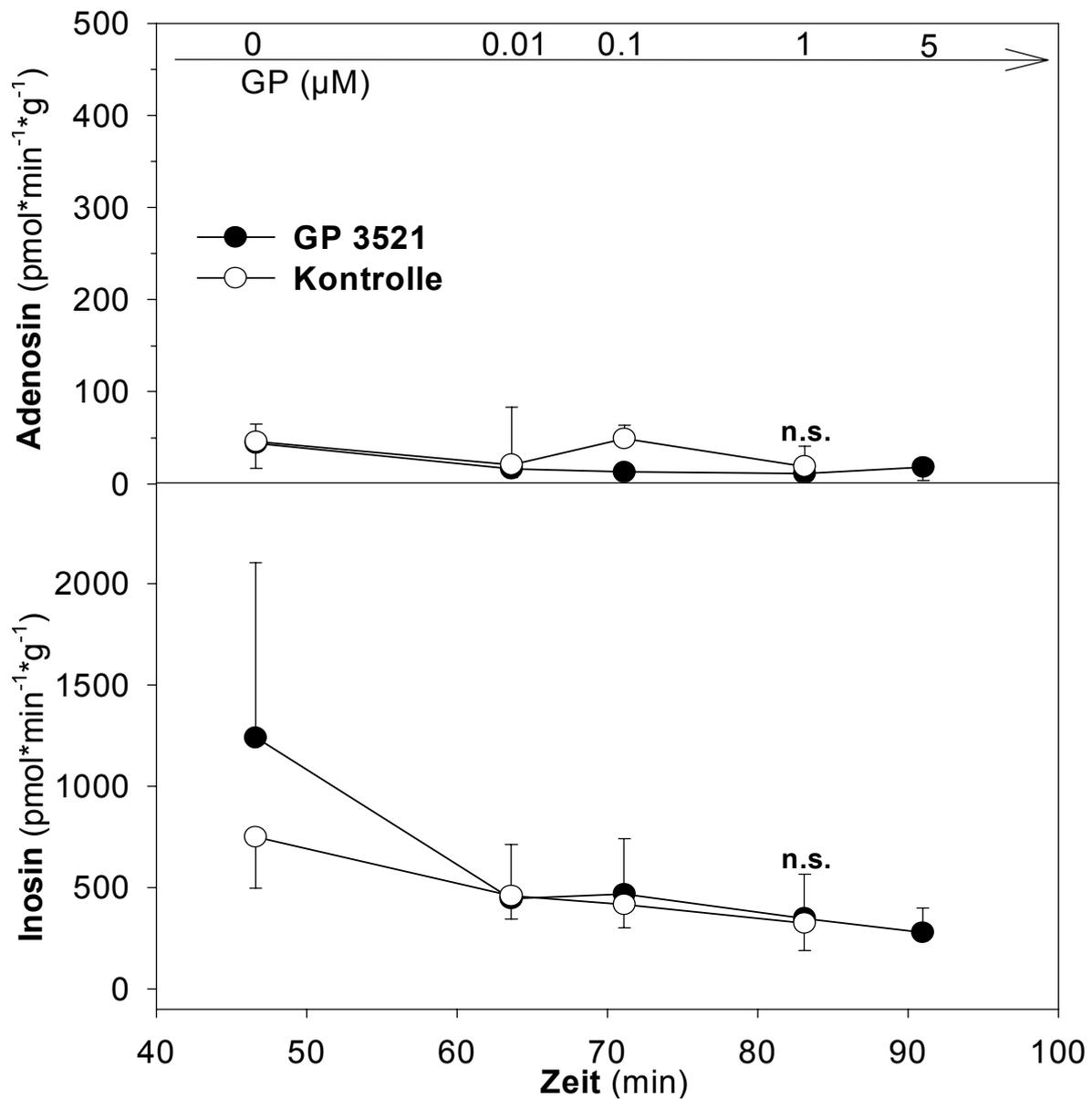


Abb. 3.10: Freisetzungsraten von Adenosin und Inosin ($\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) unter GP 3521 in aufsteigenden Konzentrationen im Zeitverlauf und in Zeitkontrollen ($n=4$, GP 3521 vs. Kontrolle, n.s.: nicht signifikant).

3.3.2.3 Purinfreisetzung in Hypoxie unter GP 3521 und EHNA

Da in Normoxie mit GP 3521 kein Effekt auf die Purinfreisetzungsraten gesehen werden konnte, wurde in den folgenden Experimenten (n=4) der Effekt von GP 3521 auf die Umsatzrate der AMP-Desaminase in Hypoxie (40% O₂) untersucht. In Hypoxie liegt eine erhöhte AMP-Konzentration mit konsekutiv erhöhter Adenosin-Konzentration vor. Bei erhöhten AMP-Konzentrationen ist eine höhere Umsatzrate der AMP-Desaminase zu erwarten. Zusätzlich wurde am Versuchsende EHNA in einer Endkonzentration von 5 µmol/l infundiert, um die Adenosin-Desaminase zu blockieren.

Im Vergleich mit einer Kontrollgruppe (n=3) wurde der Effekt von 0.1 µmol/l GP 3521 auf die Freisetzungsraten von Adenosin und Inosin in Hypoxie untersucht. Wie in Abbildung 3.11 zu sehen, hatte GP 3521 auch in diesen Versuchen keinen Einfluss auf die Freisetzungsraten. Erwartungsgemäß führte die Gabe von EHNA zu einem 2-fachen Anstieg der Adenosin-Freisetzungsraten bei konstanter Freisetzungsraten von Inosin. GP 3521 hatte also auch in Hypoxie keinen Effekt auf die Purinfreisetzungsraten am isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen, trotz der hohen Wirksamkeit in der Hemmung der AMP-Desaminase *in vitro*.

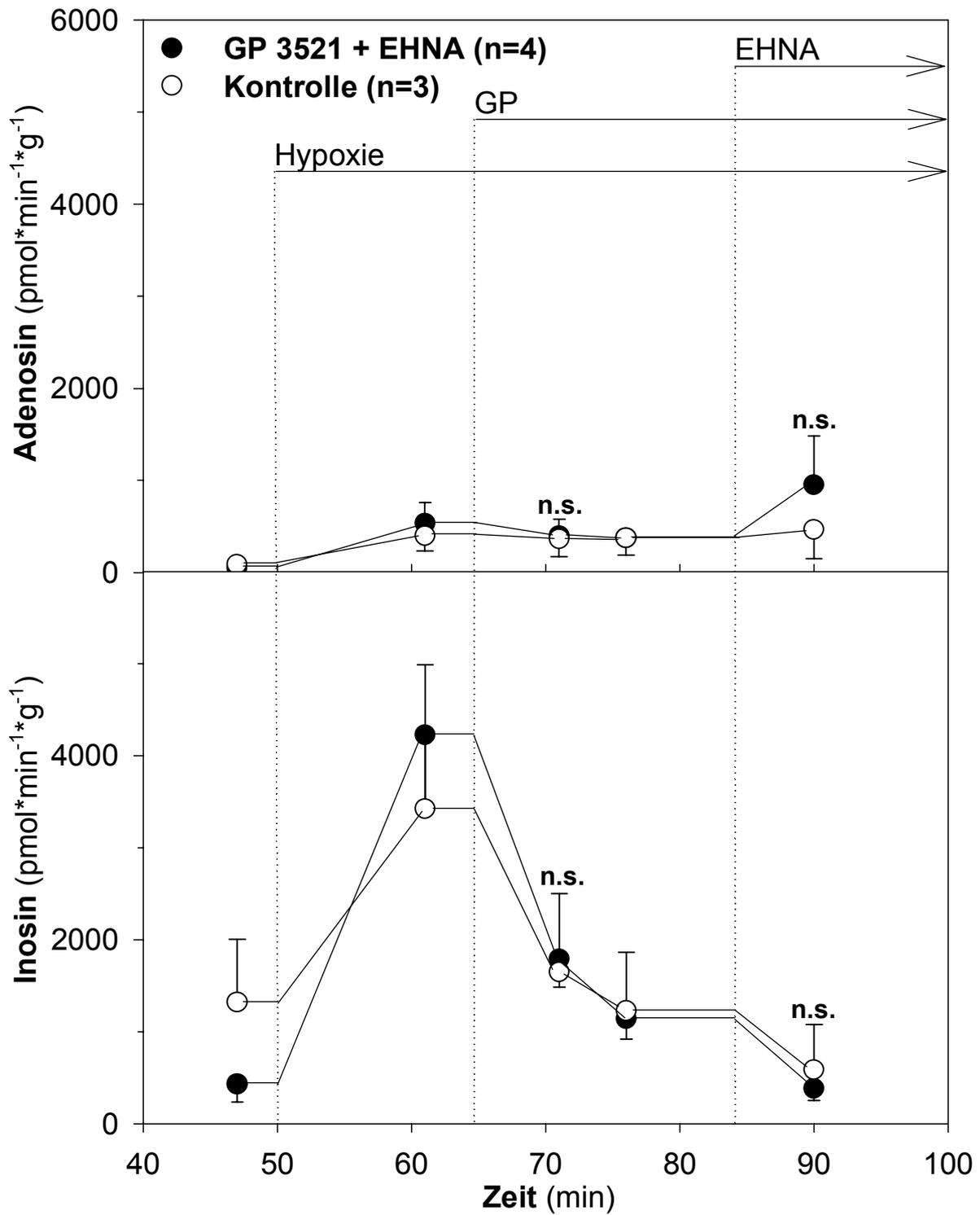


Abb. 3.11: Freisetzungsraten ($\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) von Adenosin und Inosin in Hypoxie unter $0.1 \mu\text{mol/l}$ GP 3521 ($n=4$) und $5 \mu\text{mol/l}$ EHNA ($n=3$, GP 3521 [+ EHNA] vs. Kontrolle, n.s.: nicht signifikant).

3.3.3 Wirkung von GP 3521 in globaler Ischämie

Bei diesen Versuchen (n=6) wurden Meerschweinchenherzen für 15 Minuten mit 1 $\mu\text{mol/l}$ GP 3521 behandelt und anschließend über 15 Minuten einer globalen Ischämie ausgesetzt. In den Kontrollversuchen (n=6) wurde unmittelbar für 15 Minuten eine globale Ischämie durchgeführt.

In Ischämie kommt es zur ATP-Depletion, weil die anaerobe Glykolyse den Ausfall der oxidativen Phosphorylierung in Ischämie nicht kompensieren kann. Dies führt zu einer Akkumulation von ADP und AMP bei gleichzeitigem ATP-Mangel. Das Reaktionsgleichgewicht der AMP-Desaminase liegt weit bei IMP und es wird folglich mehr AMP zu IMP umgesetzt. Unter dem Einsatz des Inhibitors GP 3521 ist also eine Abnahme der IMP-Akkumulation gegenüber den Kontrollherzen zu erwarten.

Nach 15 Minuten Ischämie fand sich in den Kontrollen 4.06 ± 1.11 nmol IMP pro mg Protein. Bei den mit GP 3521 behandelten Herzen betrug die IMP-Menge 4.61 ± 1.02 nmol/mg Protein (Abb. 3.12). Es konnte also überraschenderweise kein Unterschied in der IMP-Akkumulation gefunden werden.

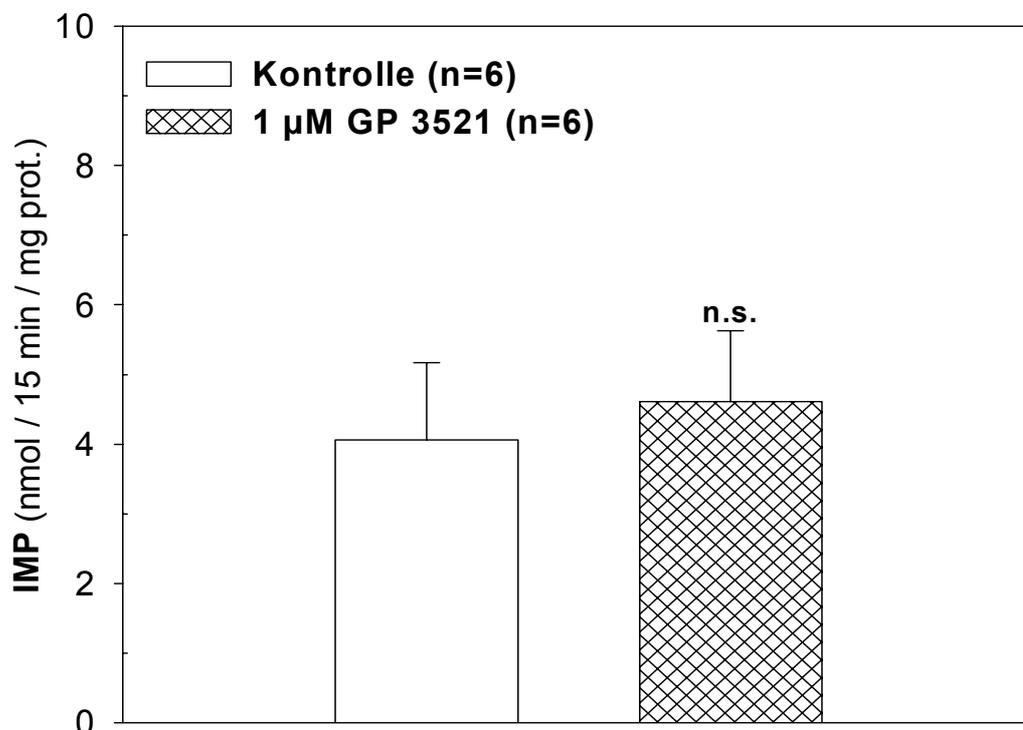


Abb. 3.12: Myokardiale IMP-Akkumulation in Meerschweinchenherzen (n=6, GP 3521 vs. Kontrolle, n.s.: nicht signifikant) nach Vorbehandlung mit 1 $\mu\text{mol/l}$ GP 3521 und anschließender Ischämie über 15 Minuten.

3.3.4 GP 3521 Permeabilität

Um die Permeabilität von Kardiomyozyten für GP 3521 zu überprüfen, wurden Rattenkardiomyozyten isoliert und mit dem Inhibitor inkubiert (n=6). Die zytosolische Fraktion wurde vom Extrazellulärraum mit Hilfe der Bromododekan-Zentrifugation und eines Extrazellulärmarkers getrennt. Die zytosolische Konzentration von GP 3521 wurde mit Hilfe der HPLC gemessen.

Die Bestimmung der Konzentration von GP 3521 im Zytosol und im Extrazellulärraum ergab wesentlich niedrigere zytosolische Konzentrationen. Die Messung der Konzentration von GP 3521 im Extrazellulärraum ergab 42.27 $\mu\text{mol/l}$, hingegen im Zytosol nur $2 \pm 10 \mu\text{mol/l}$ (Abb. 3.13). Daraus wurde gefolgert, dass GP 3521 die Zellmembran der Kardiomyozyten schlecht permeiert.

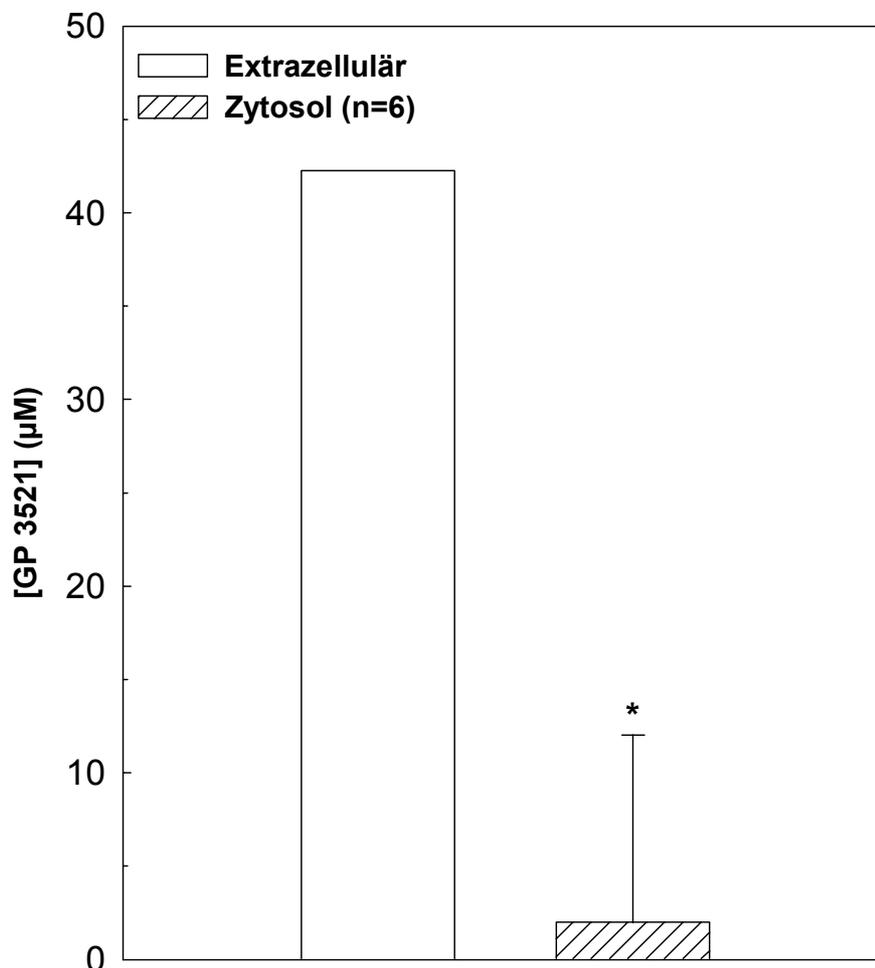


Abb. 3.13: Permeabilität von adulten Rattenkardiomyozyten für GP 3521. Kardiomyozyten wurden mit 50 $\mu\text{mol/l}$ GP 3521 für 5 Min. inkubiert. Es wurden die zytosolischen und extrazellulären Konzentrationen von GP 3521 bestimmt (n=6, *: $p < 0,05$ Zytosol vs. Extrazellulär).

3.3.5 Purinfreisetzung unter GP 3449

Da für GP 3521 eine effektive Blockade der AMP-Desaminase im myokardialen Extrakt gezeigt werden konnte, aber kein Effekt auf die Purinfreisetzung gemessen wurde und GP 3521 den intrazellulären Wirkort nicht in einer ausreichenden Konzentration erreichte, wurde ein Analogon von GP 3521 verwendet - GP 3449 ($K_i=200$ nM) - , für das gezeigt werden konnte, dass Kardiomyozyten für diesen Inhibitor eine höhere Permeabilität aufweisen als für GP 3521 (Ito, B., Gensia). In den folgenden Versuchen wurde der Effekt von GP 3449 auf die Purinfreisetzungsraten gemessen. Zuvor wurde $5 \mu\text{mol/l}$ EHNA infundiert.

Abb. 3.14 zeigt eine signifikante Abnahme der Freisetzungsraten von Inosin und Harnsäure nach Gabe von GP 3449 ($n=7$). Insbesondere nach Beginn der Infusion von GP 3449 kam es zu einem deutlichen Abfall der Inosin-Freisetzungsraten. Die Infusion von EHNA hatte in diesen Versuchen keinen deutlichen Effekt auf die Adenosin-Freisetzungsraten. Es muss anhand der vorliegenden Daten angenommen werden, dass GP 3449 zumindest teilweise über die Hemmung der AMP-Desaminase zu einer Reduktion der Inosin-Freisetzungsraten geführt hat. Die Abnahme der Inosin-Freisetzungsraten auf $\frac{1}{4}$ des Ausgangswertes scheint auf eine effektive Reduktion des IMP-Abbaus in Normoxie hinzuweisen. Eine zusätzliche Bestimmung des IMP-Gehalts sollte in den nachfolgenden Versuchen Aufschluss darüber geben, ob die Reduktion der Inosin-Freisetzungsraten tatsächlich auf eine spezifische Hemmung der AMP-Desaminase zurückzuführen ist.

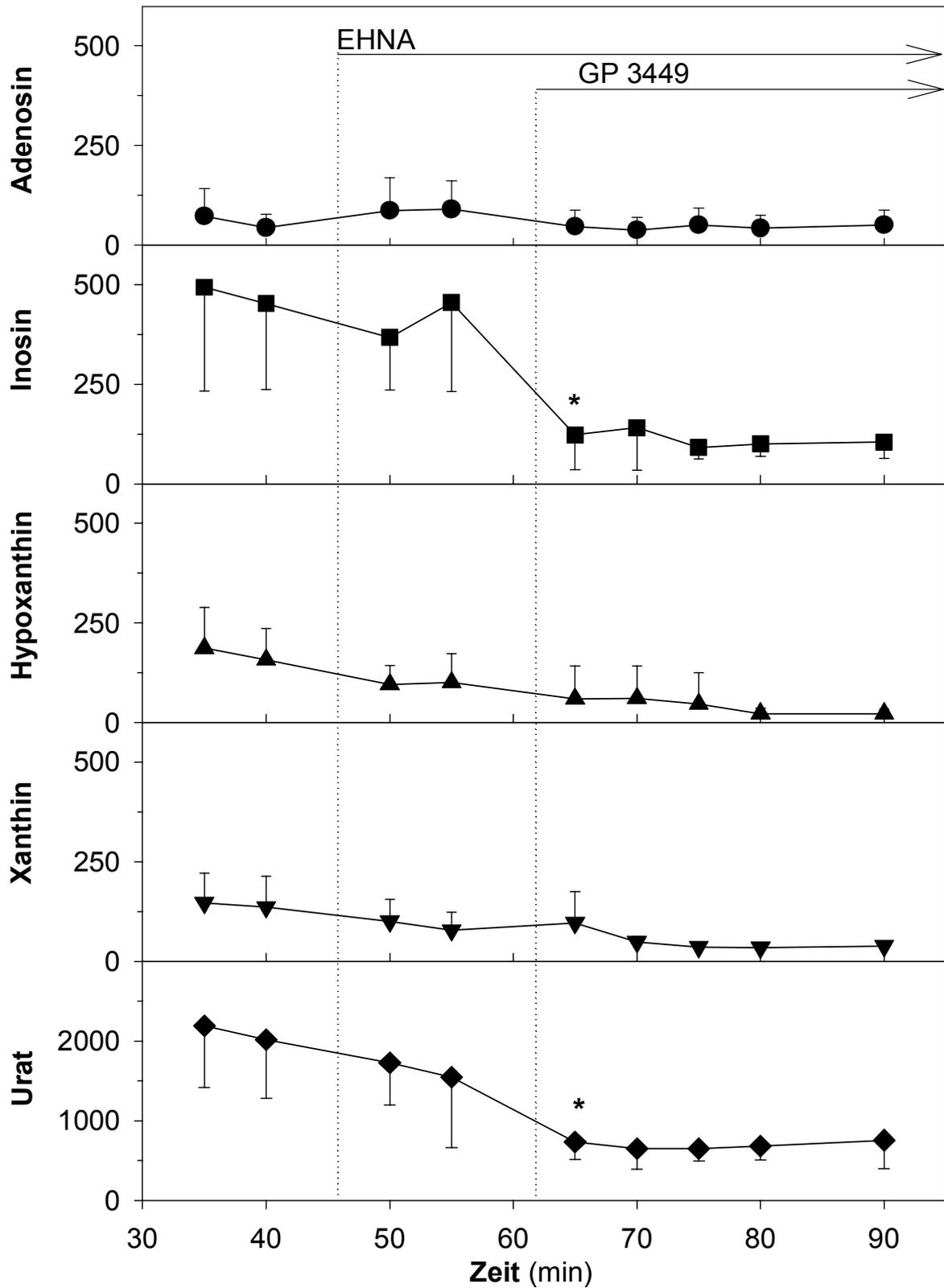


Abb. 3.14: Freisetzungsraten ($\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) von Adenosin, Inosin, Hypoxanthin, Xanthin und Urat am Meerscheinenherzen unter $10 \mu\text{M}$ GP 3449 und $5 \mu\text{M}$ EHNA ($n=7$, *: $p < 0,05$ GP 3449 vs. EHNA).

3.3.6 Wirkung von GP 3449 bei globaler Ischämie

Bei diesen Versuchen (n=7) wurden Meerschweinchenherzen für 15 Minuten mit 10 µmol/l GP 3449 und 5 µmol/l EHNA behandelt und anschließend über 20 Minuten einer globalen Ischämie ausgesetzt. In den Kontrollversuchen (n=7) wurde unmittelbar für 20 Minuten eine globale Ischämie durchgeführt.

Spezifische Hemmung der AMP-Desaminase und Adenosin-Desaminase in Ischämie dürfte zu einem erhöhten Adenosin-Gehalt (ADA-Inhibition), sowie zu einem verminderten IMP- und/oder Inosin-Gehalt auf Grund der Hemmung der AMP-Desaminase führen.

Wie erwartet führte gleichzeitiger Einsatz von EHNA und GP 3449 als ADA- und AMP-Desaminase-Inhibitoren nach 20 Minuten Ischämie zu einer Zunahme des myokardialen Adenosin-Gehalts und einer Abnahme des myokardialen Inosin-Gehalts, und hatte keine Auswirkungen auf ATP und AMP. Doch überraschenderweise führte der Einsatz der Inhibitoren zu einem signifikanten Anstieg der IMP-Konzentration. Dieser ist allein durch eine AMP-Desaminase-Blockade nicht zu erklären, sondern deutet auf eine Hemmung auch der IMP-spezifischen 5'-NT hin. Die Blockade der Adenosin-Desaminase führt erwartungsgemäß zu einem signifikanten Anstieg von Adenosin (Abb. 3.15).

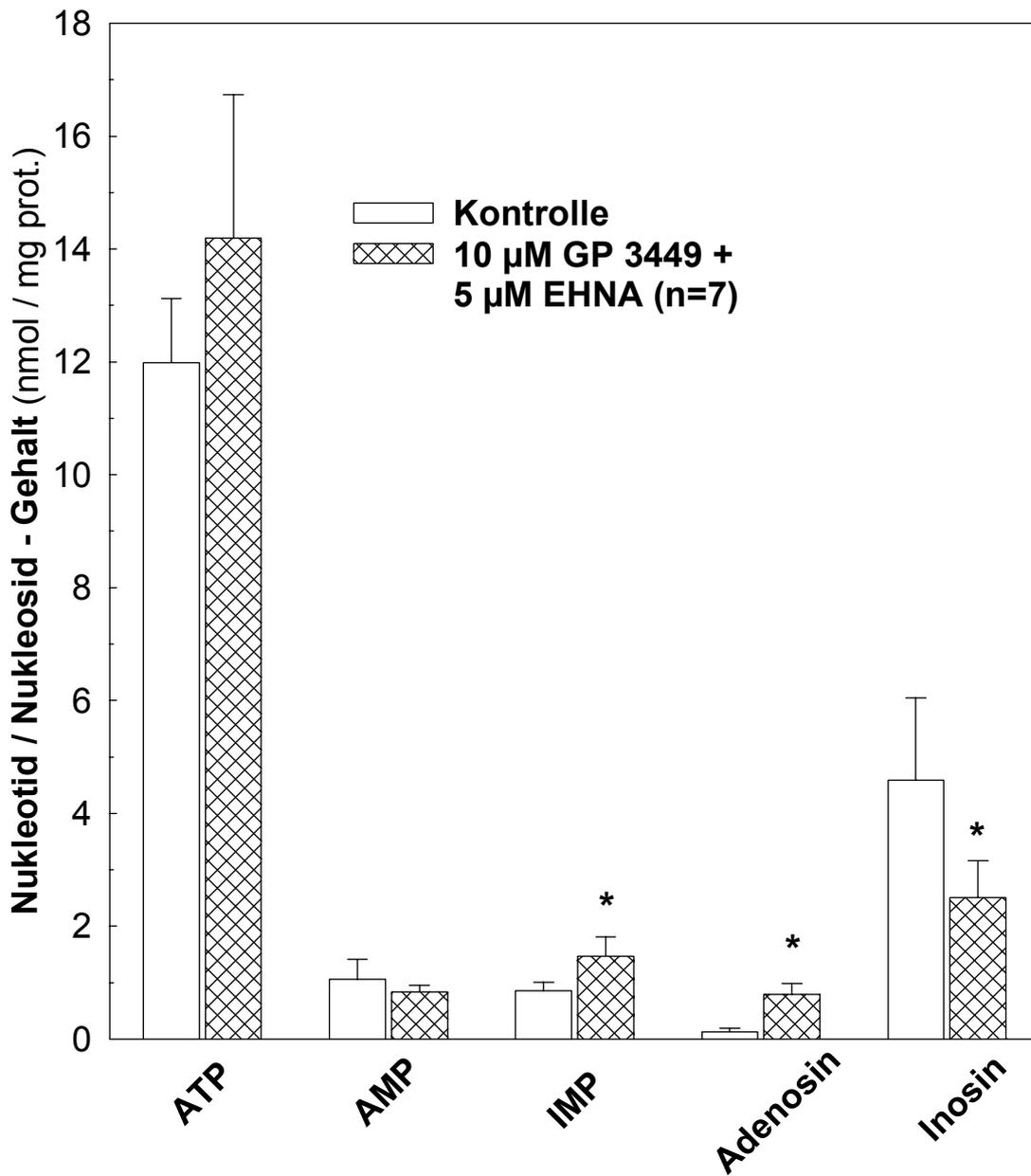


Abb. 3.15: Myokardialer ATP-, AMP-, IMP-, Adenosin- und Inosin-Gehalt nach 20 min. Ischämie (Meerschweinchenherzen, globale Ischämie, elektrisch stimuliert bei 37°C, n=7, *: p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle).

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war, die quantitative Bedeutung der myokardialen AMP-Desaminase am Modell des retrograd perfundierten, isolierten Meerschweinchenherzens in Normoxie und Hypoxie zu untersuchen. Dazu wurden pharmakologische Interventionen durchgeführt, mit denen durch gezielte Inhibition der im Adenin-Nukleotid-Stoffwechsel beteiligten Enzyme (Adenosin-Desaminase, Xanthin-Oxidase, AMP-Desaminase) eine Abschätzung der Umsatzrate der AMP-Desaminase gelang. Es wurde nachgewiesen, dass der Umsatz der AMP-Desaminase in ähnlicher Größenordnung wie der Umsatz der 5'-Nukleotidasen lag. Die Wirksamkeit der eingesetzten Substanzen wurde dabei im Enzymextrakt und *in vivo* geprüft. Es konnte gezeigt werden, dass die spezifischen Inhibitoren im Enzymextrakt die AMP-Desaminase hemmen, diese Wirkung bestätigte sich jedoch nicht in den *in vivo* Versuchen.

4.1 Bedeutung der myokardialen AMP-Desaminase

Die AMP-Desaminase spielt eine zentrale Rolle bei der Umwandlung von Adenosin-Nukleotiden zu Inosin und Guanin-Nukleotiden, bei der Stabilisierung des Adenylat-Energiehaushalts und bei Reaktionen des Purin-Nukleotid-Kreislaufs. Sie katalysiert die irreversible hydrolytische Desaminierung von 5'-AMP zu equimolaren Anteilen von 5'-IMP und Ammoniak. IMP kann dann über die IMP-spezifische 5'-Nukleotidase zu Inosin dephosphoryliert werden (IMP-Stoffwechselweg) (67;73;88). Andererseits kann 5'-AMP durch die AMP-spezifische 5'-Nukleotidase zu Adenosin dephosphoryliert werden, das dann wiederum durch die Adenosin-Desaminase zu Inosin abgebaut wird (Adenosin-Weg) (68). Die Regulation des 5'-AMP-Abbaus und damit auch die quantitativen Anteile des IMP- und Adenosin-Weges hängen also unmittelbar von den Aktivitäten dieser Enzyme ab (Abb. 4.1).

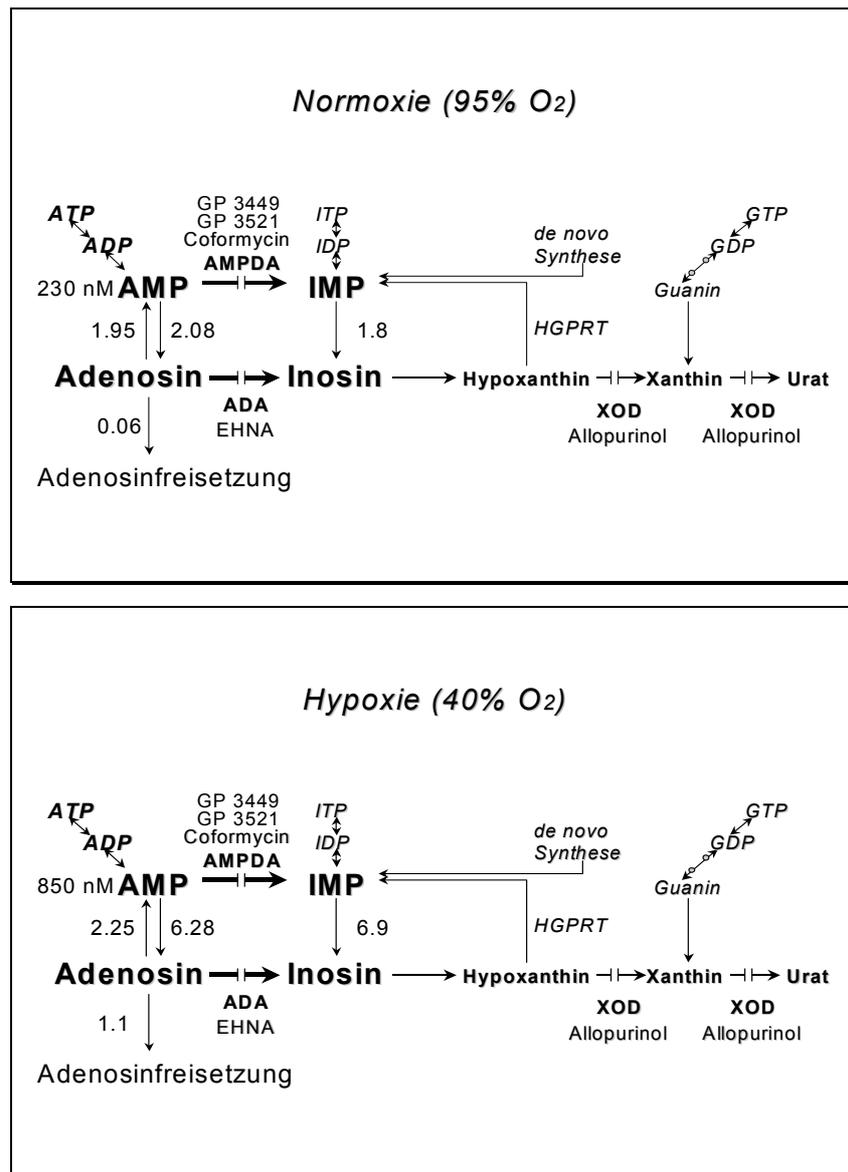


Abb. 4.1: Umsatzraten ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) und Konzentrationen im myokardialen Adenin-Nukleotid-Stoffwechsel. Daten des Adenosin-Weges wurden aus (18) entnommen.

In ³¹P-NMR-Studien wird die freie zytosolische AMP-Konzentration auf etwa 200 bis 400 nmol/l geschätzt (18;24). In Hypoxie kommt es zu einem Anstieg des freien myokardialen AMP (35). In unserem Labor konnte ein Anstieg des freien zytosolischen AMP um das 3.7-fache von 234 auf 876 nmol/l bei moderater Hypoxie gezeigt werden. Die Umsatzrate der AMP-spezifischen 5'-Nukleotidase wird über einen großen Bereich von der freien zytosolischen AMP-Konzentration reguliert und wird nicht durch Hypoxie moduliert. Ein 15-

20-facher Anstieg der Adenosin-Freisetzungsrates in Hypoxie ist auf eine Hypoxie-induzierte Inhibition der Adenosin-Kinase zurückzuführen (18).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Inosin- und Hypoxanthin-Freisetzung unter Verwendung von Inhibitoren ein indirektes Maß für die Umsatzrate der AMP-Desaminase *in vivo* darstellt und damit eine Abschätzung ermöglicht. Durch die gleichzeitige Hemmung der Adenosin-Desaminase und Xanthin-Oxidase konnte ein steady state für die Inosin- und Hypoxanthin-Freisetzung erreicht werden. Eine Abschätzung der Umsatzrate der AMP-Desaminase in Normoxie gelang uns damit über die Summe der Inosin- und Hypoxanthin-Freisetzungsrates ($1.82 \pm 0.29 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$), wobei die Inosin-Freisetzungsrates den größten Anteil hat ($1.19 \pm 0.046 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$). Legt man die Umsatzraten und zytosolischen Konzentrationen zu Grunde, die in unserem Labor experimentell ermittelt worden sind (18;47), so werden in Normoxie (95% O₂) bei einer AMP-Konzentration von 230 nmol/l über die AMP-spezifische 5'-Nukleotidase $2.08 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ Adenosin gebildet (~80% werden rephosphoryliert), $0.06 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ Adenosin freigesetzt und $0.3 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ über die Adenosin-Desaminase zu Inosin desaminiert. Über den IMP-Weg werden $1.8 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ AMP metabolisiert. Dies entspricht etwa der Bildung von Adenosin aus AMP. Vergleicht man allerdings die Freisetzungsrates des IMP-Weges ($1.8 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) mit der Freisetzungsrates von Adenosin und aus Adenosin gebildetem Inosin ($0.06 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ und $0.3 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$), so fällt der erhebliche Beitrag des IMP-Weges und damit der AMP-Desaminase an der Gesamtpurinfreisetzung auf. Der geringe Nettoeffekt des Adenosin-Weges ist also auf die hohe Rephosphorylierungsrates (>80%) des aus AMP gebildeten Adenosins zurückzuführen. Im direkten Vergleich wird etwa gleich viel AMP zu Adenosin und IMP abgebaut (Abb. 4.1).

In Hypoxie kommt es zu einem 4-fachen Anstieg der AMP-Konzentration und zu einem 4-fachen Anstieg von Inosin und Hypoxanthin ($6.96 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$). Dies spricht für einen substratabhängigen Anstieg der AMP-Desaminase-Umsatzrate. Über den Adenosin-Weg werden $6.28 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ AMP zunächst zu Adenosin dephosphoryliert. Auf Grund einer Hypoxie-induzierten Hemmung der Adenosin-Kinase wird nur noch 1/3 des so gebildeten Adenosin zu AMP rephosphoryliert ($2.25 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$), die übrigen 2/3 werden als Adenosin freigesetzt bzw. zu Inosin desaminiert ($3.25 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$). Damit haben beide Stoffwechselwege in Hypoxie einen etwa gleich großen Anteil am Abbau von AMP.

Es ist also zu postulieren, dass die kardiale AMP-Desaminase-Umsatzrate entsprechend dem Anstieg der AMP-Konzentration und damit erhöhter Substratkonzentration bei moderater Hypoxie zunimmt und AMP in etwa gleichem Maße zu IMP und Adenosin abgebaut wird.

Voraussetzung für eine Differenzierung des Adenosin-Weges vom IMP-Weg ist eine effiziente Blockade der Adenosin-Desaminase, wodurch Inosin und Hypoxanthin nicht mehr als Metabolite von Adenosin entstehen, sondern nur aus dem Abbau von IMP hervorgehen. EHNA ist ein spezifischer Inhibitor der Adenosin-Desaminase (70) und hat keine Wirkung auf die kardiale AMP-Desaminase bis zu Konzentrationen von 10 $\mu\text{mol/l}$ (81). EHNA wurde in dieser Arbeit in einer Konzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt. In dieser Konzentration zeigt sich eine praktisch vollständige Inhibition im normoxischen Herzen (47). Dies stimmt mit dem niedrigen K_i -Wert von 1.2 nmol/l gut überein, der eine >99% Inhibition der Adenosin-Desaminase erwarten lässt (65). Deussen et al. sahen eine Inosin-Freisetzungsrates von 490 $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, durch EHNA wurde eine Abnahme auf 410 $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ gesehen. Die in unserer Arbeit beobachtete Freisetzungsrates von Inosin ist dagegen doppelt so hoch. Dies könnte durch einen höheren AMP-Desaminase-Umsatz in unserem Modell bedingt sein. Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit die Xanthin-Oxidase gehemmt. Unter diesen Bedingungen kann Inosin nur bis zum Hypoxanthin abgebaut werden, während Xanthin und Harnsäure als weitere Purin-Abbauprodukte nun dem GMP-Abbau zugeordnet werden können. Hemmung der Xanthin-Oxidase erlaubt daher eine genauere Abschätzung der Inosin-Freisetzungsrates. Decking et al. legten ihrer Bestimmung der Adenosin-Desaminase-Umsatzrate ein Modell des Adenosin-Stoffwechsels zu Grunde. Die Umsatzraten beruhen auf experimentellen Daten mit EHNA als Inhibitor der Adenosin-Desaminase (47). Demnach liegt in Normoxie die Umsatzrate der Adenosin-Desaminase bei 300 $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ und in Hypoxie bei 3250 $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

Für Allopurinol – einem kompetitiven Inhibitor der Xanthin-Oxidase – wurden kardioprotektive Effekte beschrieben. Xanthin-Oxidase bildet unter anderem freie Sauerstoffradikale, die bei Reperfusion nach kurzer Ischämie zu einer reversiblen postischämischen myokardialen Dysfunktion (Stunning) führen (4). Als Inhibitor trägt Allopurinol zum protektiven Effekt gegen das myokardiale Stunning bei (10). Der genaue Mechanismus der Protektion ist allerdings unbekannt. Nach neueren Studien führt Allopurinol zu einer Ca^{2+} -Sensibilisierung der Myofilamente (63). Saavedra et al. postulieren eine Verbindung zwischen der Aktivität der Xanthin-Oxidase und der NO-Synthase. So konnte eine durch Inhibition der Xanthin-Oxidase verbesserte kardiale Leistung durch Inhibition der

NO-Synthase wieder aufgehoben werden (66). Ashraf beschreibt eine Abnahme der Xanthin-Oxidase-Aktivität nach Inhibition mit Allopurinol, aber keine komplette Deaktivierung (2). Übereinstimmend mit diesen Studien haben wir Allopurinol in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt und konnten eine dramatische Abnahme der Harnsäure-Freisetzungsraten auf 1/5 des basalen Wertes feststellen. Die Freisetzungsraten von Inosin, Hypoxanthin und Xanthin hingegen blieben nahezu konstant. Bei einer vollständigen Blockade der Xanthin-Oxidase würde also 1/5 der Harnsäure-Freisetzung aus dem Guanin-Nukleotid-Abbau stammen (s. Abb. 4.1).

Im Adenin-Nukleotid-Stoffwechsel anfallendes Hypoxanthin und Guanin werden durch die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) zu den Nukleotiden IMP und GMP resynthetisiert. Offensichtlich spielt die HGPRT im Herzen keine große Rolle (89;93). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der HGPRT auf die Freisetzungsraten von Inosin und Hypoxanthin daher nicht untersucht.

Der Einsatz von Methotrexat als Inhibitor der Purin-de-novo-Synthese führte zu keiner Änderung der Freisetzungsraten von Inosin und Hypoxanthin, so dass die Purin-de-novo-Synthese bei der Bestimmung der AMP-Desaminase-Umsatzrate nicht berücksichtigt werden muss.

Die Aktivität der AMP-Desaminase betrug in einer Arbeit von Zoref-Shani et al. in Zellkulturen von Rattenkardiomyozyten $77.9 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (92). Hierbei handelt es sich allerdings um die Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) und nicht um Umsatzraten, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet werden, wodurch ein direkter Vergleich der Befunde nicht möglich ist. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte jedoch feststellen, dass die Aktivität der AMP-Desaminase 7-fach höher als die der AMP-spezifischen 5'-Nukleotidase ist und unter physiologischen Bedingungen kultivierte Rattenkardiomyozyten 85% des AMP zu IMP über die AMP-Desaminase abbauen (91). Bei unseren *in vivo* Versuchen werden in Normoxie $2.08 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ AMP über die AMP-spezifische 5'-Nukleotidase zu Adenosin umgesetzt und $1.8 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, also 46% des AMP zu IMP metabolisiert.

Chen et al. bestimmten bei 2-deoxy-D-Glukose(2DG)- und anoxischer Perfusion an Rattenherzen die gesamte Purinfreisetzung, um die Hypothese zu stützen, dass die AMP-Desaminase durch anorganisches Phosphat im anoxischen Herz inhibiert wird. In ihrer Kontrollgruppe wurde eine Umsatzrate über den Adenosin-Weg von $0.5 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ und

über den IMP-Weg von $11 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ aus den Freisetzungsraten von Adenosin, Inosin und Inosinkataboliten berechnet. Da der Umsatz des Adenosin-Weges aus der Adenosin-Freisetzung bestimmt wurde, ist hier die Abbaurate von AMP zu Adenosin auf Grund der Adenosin-Kinase-vermittelten Adenosin-Rephosphorylierung unterschätzt worden. Weiterhin wurde der Einfluss des Guanin-Nukleotidabbaus auf die Harnsäure-Freisetzung nicht berücksichtigt. Unter 2DG-Perfusion betragen die Umsatzraten über den Adenosin-Weg $5 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ und über den IMP-Weg $165 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, während sich das Verhältnis bei anoxischer Perfusion umkehrt und der Adenosin-Weg mit $55 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ (77%) über den IMP-Weg mit $25 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ (23%) dominiert (11). Andere Studien zeigen hingegen, dass IMP in anoxischen Rattenherzen das dominierende Endprodukt ist (40) und es in Ischämie zu einem signifikanten IMP-Anstieg kommt (36;69).

Verschiedene Faktoren führen zu einer Stimulation der AMP-Desaminase, u.a. α_1 -adrenerge Agonisten, PKC (Protein Kinase C) und Adenosin (37-39). Ansteigende intrazelluläre cAMP-Level korrelieren mit der Aktivität der AMP-Desaminase (36). Die Aktivität der AMP-Desaminase in Hypoxie wird wahrscheinlich durch komplexe Vorgänge reguliert, die verschiedene Faktoren beinhalten. Die hier dargestellten Befunde zeigen aber, dass bei moderater Hypoxie die erhöhte AMP-Konzentration für die Umsatzzunahme der AMP-Desaminase verantwortlich ist und andere Regulationsmechanismen nicht erforderlich sind. Bei einem 4-fachen Anstieg der AMP-Konzentration kommt es zu einem vergleichbaren Anstieg der Inosin- und Hypoxanthin-Freisetzungsraten und damit der Umsatzrate der AMP-Desaminase. Bleibt die AMP-Konzentration weit unterhalb von K_M der AMP-Desaminase, ist die Aktivität des Enzyms also unverändert.

Um die Umsatzrate der AMP-Desaminase möglichst genau abschätzen zu können, ist eine effektive und selektive Hemmung der im Adenin-Nukleotid-Stoffwechsel beteiligten Enzyme erforderlich. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit sicher gewährleistet werden. Auch andere Stoffwechselwege, die einen Einfluss auf den IMP-Weg haben, hier die Purin-de-novo-Synthese, müssen berücksichtigt werden. Auch für diesen Weg konnte ein bedeutender Einfluss auf den IMP-Weg verneint werden.

4.2 Direkte Inhibition der AMP-Desaminase zur Bestimmung der Umsatzrate

Eine alternative Möglichkeit, die Umsatzrate der AMP-Desaminase zu bestimmen, ist es, die AMP-Desaminase selektiv und effizient zu hemmen, und die Auswirkungen dieser Blockade

auf z.B. die Freisetzung von Inosin und Hypoxanthin zu untersuchen. Ein klassischer Inhibitor der AMP-Desaminase ist Coformycin. Dieser hemmt neben der AMP-Desaminase auch die Adenosin-Desaminase (1;5;17;69;77;78).

Um eine maximale Inhibition der AMP-Desaminase in isolierten Rattenhepatozyten herbeizuführen, setzten van den Berghe et al. 50 $\mu\text{mol/l}$ Coformycin ein (85). Die Inhibition der AMP-Desaminase führte zu einer 85%igen Abnahme der Allantoinproduktion, dem Endprodukt der Adenosin-Nukleotide. Bei den meisten Säugetieren wird Harnsäure nach Abbau zu Allantoin ausgeschieden, beim Menschen und Menschenaffen wird Harnsäure unverändert ausgeschieden. In einer Arbeit von Thakkar et al. führten mikromolare Konzentrationen von Coformycin zu einer Inhibition der kardialen AMP-Desaminase bei 5 mmol/l AMP als Substrat (81). Da es sich hierbei um hochgereinigte, isolierte AMP-Desaminase handelt, erklärt sich der Einsatz geringerer Konzentrationen von Coformycin als bei der Arbeit von van den Berghe, bei der es sich um ein zelluläres System handelte. Hohl et al. verwendeten bis zu 0.5 mmol/l Coformycin bei ATP-depletierten Rattenmyozyten und konnten keine Reduktion der IMP-Produktion feststellen. Einen leichten Anstieg der IMP-Produktion führten sie auf einen sekundären Effekt durch Inhibition der Adenosin-Desaminase durch Coformycin zurück (37). Wir untersuchten die Kinetik der AMP-Desaminase bei unterschiedlichen Konzentrationen von Coformycin im myokardialen Enzymextrakt und konnten feststellen, dass bereits bei Konzentrationen von 1 $\mu\text{mol/l}$ Coformycin eine deutliche Reduktion der AMP-Desaminase-Umsatzrate erreicht wird. Überraschenderweise hatte Coformycin in den *in vivo* Versuchen in der verwendeten Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ nur einen geringen Effekt auf die Freisetzungsraten von Inosin, Hypoxanthin, Xanthin und Harnsäure, so dass wir annehmen müssen, dass die für eine effiziente Hemmung der AMP-Desaminase notwendige intrazelluläre Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ auch bei der Gabe von 10 $\mu\text{mol/l}$ nicht erreicht wurde.

In anderen Studien wurden Coformycin-Analoga vorgestellt, die sich durch eine selektive inhibitorische Potenz für die AMP-Desaminase auszeichnen (5-7;43-45). In der vorliegenden Arbeit wurden die Coformycin-Analoga GP 3521 und GP 3449 untersucht.

Für GP 3521 (compound 4a) liegen bisher *in vitro* Studien vor. Der K_i -Wert für die AMP-Desaminase liegt bei 15 nM, die K_i für die Adenosin-Desaminase über 7500 nM, die orale Bioverfügbarkeit liegt in Ratten bei 5% (43). Wir haben zunächst GP 3521 im myokardialen Enzymextrakt verwendet und konnten dabei eine effektive Hemmung der AMP-Desaminase feststellen. Insbesondere die Abnahme der IMP- und Inosin-Bildung zeigen die fast

vollständige Hemmung der AMP-Desaminase bei den hier eingesetzten Substratkonzentrationen und einer InhibitorKonzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$.

Da für GP 3521 im myokardialen Enzymextrakt ein Effekt auf die AMP-Desaminase gezeigt werden konnte, aber weder eine Wirkung in Normoxie noch in Hypoxie auf die Purinfreisetzungsrates im isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen vorhanden war, und auch kein Einfluss auf die IMP-Akkumulation nach globaler Ischämie nachgewiesen werden konnte, wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass GP 3521 den intrazellulären Wirkort nicht in ausreichenden Konzentrationen erreicht.

Um diese Hypothese zu stützen, wurde die Permeabilität von Kardiomyozyten für GP 3521 geprüft. Für diesen Inhibitor der AMP-Desaminase liegen Studien zu isolierten Zellen vor (Kaninchenerythrozyten, Endothelzellen), die eine gute Permeabilität zeigen (43). Wir konnten im Gegensatz dazu nur eine unzureichende Permeabilität des Sarkolems der Rattenkardiomyozyten für GP 3521 feststellen. Wir verwendeten dazu eine Methode mit der die Zellen vom Extrazellulärraum mit Hilfe der Bromododekan-Zentrifugation und eines Extrazellulärmarkers getrennt werden, und für den noch vorhandenen extrazellulären Raum mit Hilfe eines Extrazellulärmarkers korrigiert wird (76). Ein weiterer, von uns eingesetzter Inhibitor - GP 3449 - zeigt eine höhere Permeabilität als GP 3521 (Ito, B., Gensia). Doch unsere Befunde lassen vermuten, dass dieser Inhibitor nicht nur die AMP-Desaminase sondern auch die IMP-spezifische 5'-Nukleotidase hemmt. Durch die spezifische und selektive Hemmung der AMP-Desaminase durch GP 3449 wäre nämlich eine Abnahme der IMP-Konzentration und nachfolgend der Inosin-Freisetzungsrates zu erwarten gewesen. Ein Anstieg der IMP-Konzentration hingegen, wie er hier gesehen wurde, lässt vermuten, dass die IMP-spezifische 5'-Nukleotidase, die die Dephosphorylierung von IMP zu Inosin katalysiert, durch den Inhibitor partiell gehemmt wurde. Das erklärt wahrscheinlich auch die Abnahme der Inosin-Freisetzungsrates.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren Coformycin und das Coformycin-Analogon GP 3521 *in vitro* eine effektive Hemmung der AMP-Desaminase zeigen. Dies konnte *in vivo* jedoch nicht bestätigt werden. Ursache hierfür könnte sein, dass weder Coformycin noch GP 3521 die Zellmembranen der Kardiomyozyten in ausreichenden Konzentrationen permeieren und somit keine ausreichende Wirkkonzentration intrazellulär erreichen. GP 3449 scheint nicht hochselektiv für die AMP-Desaminase zu sein, sondern gleichzeitig auch die IMP-spezifische 5'-Nukleotidase zu hemmen.

4.3 Abschließende Betrachtung

In der vorliegenden Arbeit wurde am Modell des isoliert retrograd perfundierten Meerschweinchenherzens in Normoxie und Hypoxie die Bedeutung der AMP-Desaminase im kardialen Adenin-Nukleotid-Stoffwechsel charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die AMP-Desaminase in Normoxie und Hypoxie einen erheblichen Anteil an der Bildung von Inosin und Purinkataboliten hat, und dass sowohl in Normoxie als auch in Hypoxie AMP zu annähernd gleichen Teilen zu Adenosin (5'-Nukleotidase) und IMP (AMP-Desaminase) abgebaut wird. Da die Bildung von IMP der Bildung des kardioprotektiven Rezeptoragonisten Adenosin entgegenwirkt, stellt sich die Frage, welchen Vorteil die relativ große Umsatzrate dieses Stoffwechselweges mit sich bringt. Hohl postuliert, dass die Freisetzung von Ammoniak, das bei der Desaminierung von AMP anfällt, die steigenden H^+ -Ionenkonzentration, die durch die ATP-Hydrolyse entsteht, abpuffern könnte. Weiterhin stünde IMP, das nicht ohne weiteres die Zellmembran passieren kann, für eine weitere Resynthese von AMP zur Verfügung (36). Unter katabolen Bedingungen, bei denen ADP verstärkt zu AMP abgebaut wird, wirkt der weitere Abbau von AMP zu Adenosin und IMP dem Anstieg der AMP-Konzentration entgegen. Dies limitiert in Situationen, in denen die ATP-Bildung und Verbrauch nicht mehr im Gleichgewicht stehen, die Zunahme von ADP und AMP. Dadurch wird ein rascher Abfall der freien Energie der ATP-Hydrolyse verhindert (48). Eine Resynthese von Hypoxanthin und Guanin zu IMP scheint nach der aktuellen Datenlage im Herzen keine Rolle zu spielen. Es bleibt weiteren Studien vorbehalten, die Bedeutung der IMP-spezifischen 5'-Nukleotidase (cN-II) zu klären (67). Eine Hemmung des IMP-Abbaus dieses Enzyms hätte dann den hier (s. Abb. 3.15) gezeigten Erhalt des IMP-Spiegels zur Folge.

Durch eine direkte pharmakologische Intervention sollte die AMP-Desaminase weiter charakterisiert werden. Bei den hier dargestellten *in vivo* Versuchen konnte allerdings keine effektive Hemmung der AMP-Desaminase gezeigt werden. Als Ursache wurde eine mangelnde Penetration der Kardiomyozyten durch den Wirkstoff GP 3521 vermutet. Für den zweiten spezifischen Inhibitor GP 3449 lassen die vorliegenden Daten die Interpretation zu, dass die IMP-spezifische 5'-Nukleotidase ebenfalls durch den Wirkstoff gehemmt wird. In dieser Arbeit konnte also durch Inhibition der Adenosin-Desaminase und Xanthin-Oxidase eine Charakterisierung der AMP-Desaminase und deren Bedeutung im kardialen Adenin-Nukleotid-Stoffwechsel ermöglicht werden.

5 Literaturverzeichnis

1. Agarwal, R. P. Inhibitors of adenosine deaminase. *Pharmacol. Ther.* 17: 399-429, 1982.
2. Ashraf, M. and Z. Q. Samra. Subcellular distribution of xanthine oxidase during cardiac ischemia and reperfusion: an immunocytochemical study. *J.Submicrosc.Cytol.Pathol.* 25: 193-201, 1993.
3. Berne, R. M. Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am.J.Physiol.* 204, 317-322. 1963.
4. Bolli, R. Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation* 82: 723-738, 1990.
5. Bookser, B. C., S. R. Kasibhatla, J. R. Appleman, and M. D. Erion. Design and synthesis of the first potent, selective, and cell penetrating adenosine 5'-monophosphate deaminase inhibitors. *Adv.Exp.Med.Biol.* 431: 853-857, 1998.
6. Bookser, B. C., S. R. Kasibhatla, J. R. Appleman, and M. D. Erion. AMP deaminase inhibitors. 2. Initial discovery of a non-nucleotide transition-state inhibitor series. *J.Med.Chem.* 43: 1495-1507, 2000.
7. Bookser, B. C., S. R. Kasibhatla, and M. D. Erion. AMP deaminase inhibitors. 4. Further N3-substituted coformycin aglycon analogues: N3-alkylmalonates as ribose 5'-monophosphate mimetics. *J.Med.Chem.* 43: 1519-1524, 2000.

8. Borgers, M. and F. Thone. Species differences in adenosine metabolic sites in the heart. *Histochem.J.* 24: 445-452, 1992.
9. Borst, M. M. and J. Schrader. Adenine nucleotide release from isolated perfused guinea pig hearts and extracellular formation of adenosine. *Circ.Res.* 68: 797-806, 1991.
10. Charlat, M. I., P. G. O'Neill, J. M. Egan, D. R. Abernethy, L. H. Michael, M. L. Myers, R. Roberts, and R. Bolli. Evidence for a pathogenetic role of xanthine oxidase in the "stunned" myocardium. *Am.J.Physiol* 252: H566-H577, 1987.
11. Chen, W. and M. Gueron. AMP degradation in the perfused rat heart during 2-deoxy-D-glucose perfusion and anoxia. Part II: The determination of the degradation pathways using an adenosine deaminase inhibitor. *J.Mol.Cell Cardiol.* 28: 2175-2182, 1996.
12. Chen, W., J. Hoerter, and M. Gueron. A comparison of AMP degradation in the perfused rat heart during 2- deoxy-D-glucose perfusion and anoxia. Part I: The release of adenosine and inosine. *J.Mol.Cell Cardiol.* 28: 2163-2174, 1996.
13. Cohen, M. V., R. S. Walsh, M. Goto, and J. M. Downey. Hypoxia preconditions rabbit myocardium via adenosine and catecholamine release. *J.Mol.Cell Cardiol.* 27: 1527-1534, 1995.

14. Darvish, A., R. W. Pomerantz, P. G. Zografides, and P. J. Metting. Contribution of cytosolic and membrane-bound 5'-nucleotidases to cardiac adenosine production. *Am.J.Physiol* 271: H2162-H2167, 1996.
15. Decking, U. K. In vivo NMR spektroskopische Untersuchungen des kardialen Stoffwechsels. 2000. Shaker.
16. Decking, U. K., S. Arens, G. Schlieper, K. Schulze, and J. Schrader. Dissociation between adenosine release, MVO₂, and energy status in working guinea pig hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 272: H371-H381, 1997.
17. Decking, U. K., E. Juengling, and H. Kammermeier. Interstitial transudate concentration of adenosine and inosine in rat and guinea pig hearts. *Am.J.Physiol* 254: H1125-H1132, 1988.
18. Decking, U. K., G. Schlieper, K. Kroll, and J. Schrader. Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. *Circ.Res.* 81: 154-164, 1997.
19. Deussen, A. Quantitative integration of different sites of adenosine metabolism in the heart. *Ann.Biomed.Eng* 28: 877-883, 2000.
20. Deussen, A., M. Stappert, S. Schafer, and M. Kelm. Quantification of extracellular and intracellular adenosine production: understanding the transmembranous concentration gradient. *Circulation* 99: 2041-2047, 1999.

21. Dobson, J. G., Jr., R. W. Ordway, and R. A. Fenton. Endogenous adenosine inhibits catecholamine contractile responses in normoxic hearts. *Am.J.Physiol* 251: H455-H462, 1986.
22. Fishbein, W. N., V. W. Armbrustmacher, and J. L. Griffin. Myoadenylate deaminase deficiency: a new disease of muscle. *Science* 200: 545-548, 1978.
23. Fishbein, W. N., R. L. Sabina, N. Ogasawara, and E. W. Holmes. Immunologic evidence for three isoforms of AMP deaminase (AMPD) in mature skeletal muscle. *Biochim.Biophys.Acta* 1163: 97-104, 1993.
24. Frederich, M. and J. A. Balschi. The relationship between AMP-activated protein kinase activity and AMP concentration in the isolated perfused rat heart. *J.Biol.Chem.* 277: 1928-1932, 2002.
25. Gao, Z. P., H. F. Downey, W. L. Fan, and R. T. Mallet. Does interstitial adenosine mediate acute hibernation of guinea pig myocardium? *Cardiovasc.Res.* 29: 796-804, 1995.
26. Gerlach, E., Deuticke, B., and Dreisbach, R. H. Der Nucleotid-Abbau im Herzmuskel bei Sauerstoffmangel und seine mögliche Bedeutung für die Coronardurchblutung. *Naturwissenschaften* 50, 228-229. 1963.
27. Gerlach, E., S. Nees, and B. F. Becker. The vascular endothelium: a survey of some newly evolving biochemical and physiological features. *Basic Res.Cardiol.* 80: 459-474, 1985.

28. Gustafson, L. A., C. J. Zuurbier, J. E. Bassett, J. P. Barends, J. H. van Beek, J. B. Bassingthwaite, and K. Kroll. Increased hypoxic stress decreases AMP hydrolysis in rabbit heart. *Cardiovasc.Res.* 44: 333-343, 1999.
29. He, M. X., M. W. Gorman, G. D. Romig, R. A. Meyer, and H. V. Sparks, Jr. Adenosine formation and energy status during hypoperfusion and 2- deoxyglucose infusion. *Am.J.Physiol* 260: H917-H926, 1991.
30. Headrick, J., K. Clarke, and R. J. Willis. Adenosine production and energy metabolism in ischaemic and metabolically stimulated rat heart. *J.Mol.Cell Cardiol.* 21: 1089-1100, 1989.
31. Headrick, J. and R. J. Willis. Contribution of adenosine to changes in coronary flow in metabolically stimulated rat heart. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 66: 171-173, 1988.
32. Headrick, J. P., L. C. Armiger, and R. J. Willis. Behaviour of energy metabolites and effect of allopurinol in the "stunned" isovolumic rat heart. *J.Mol.Cell Cardiol.* 22: 1107-1116, 1990.
33. Headrick, J. P., G. P. Matherne, and R. M. Berne. Myocardial adenosine formation during hypoxia: effects of ecto-5'- nucleotidase inhibition. *J.Mol.Cell Cardiol.* 24: 295-303, 1992.
34. Headrick, J. P. and R. J. Willis. 5'-Nucleotidase activity and adenosine formation in stimulated, hypoxic and underperfused rat heart. *Biochem.J.* 261: 541-550, 1989.

35. Headrick, J. P. and R. J. Willis. Adenosine formation and energy metabolism: a ³¹P-NMR study in isolated rat heart. *Am.J.Physiol* 258: H617-H624, 1990.
36. Hohl, C. M. AMP deaminase in piglet cardiac myocytes: effect on nucleotide metabolism during ischemia. *Am.J.Physiol* 276: H1502-H1510, 1999.
37. Hohl, C. M., D. K. Wimsatt, G. P. Brierley, and R. A. Altschuld. IMP production by ATP-depleted adult rat heart cells. Effects of glycolysis and alpha 1-adrenergic stimulation. *Circ.Res.* 65: 754-760, 1989.
38. Hu, B., R. A. Altschuld, and C. M. Hohl. Phorbol esters and cyclic AMP activate AMP deaminase in adult rat cardiac myocytes. *Arch.Biochem.Biophys.* 291: 100-106, 1991.
39. Hu, B., R. A. Altschuld, and C. M. Hohl. Adenosine stimulation of AMP deaminase activity in adult rat cardiac myocytes. *Am.J.Physiol* 264: C48-C53, 1993.
40. Humphrey, S. M., D. G. Holliss, and R. N. Seelye. Adenine pool catabolism in the ischemic, the calcium-depleted ischemic, and the substrate free anoxic isolated rat heart: relationship to contracture development. *J.Mol.Cell Cardiol.* 16: 1127-1136, 1984.
41. Janero, D. R. and C. Yarwood. Oxidative modulation and inactivation of rabbit cardiac adenylate deaminase. *Biochem.J.* 306 (Pt 2): 421-427, 1995.

42. Jarasch, E. D., C. Grund, G. Bruder, H. W. Heid, T. W. Keenan, and W. W. Franke. Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Cell* 25: 67-82, 1981.
43. Kasibhatla, S. R., B. C. Bookser, J. R. Appleman, G. Probst, W. Xiao, J. M. Fujitaki, and M. D. Erion. Design, synthesis, and structure-activity relationships of the first highly potent, selective, and bioavailable adenosine 5'-monophosphate deaminase inhibitors. *Adv.Exp.Med.Biol.* 431: 849-852, 1998.
44. Kasibhatla, S. R., B. C. Bookser, G. Probst, J. R. Appleman, and M. D. Erion. AMP deaminase inhibitors. 3. SAR of 3-(carboxyarylalkyl)coformycin aglycon analogues. *J.Med.Chem.* 43: 1508-1518, 2000.
45. Kasibhatla, S. R., B. C. Bookser, W. Xiao, and M. D. Erion. AMP deaminase inhibitors. 5. Design, synthesis, and SAR of a highly potent inhibitor series. *J.Med.Chem.* 44: 613-618, 2001.
46. Kochan, Z., R. T. Smolenski, M. H. Yacoub, and A. L. Seymour. Nucleotide and adenosine metabolism in different cell types of human and rat heart. *J.Mol.Cell Cardiol.* 26: 1497-1503, 1994.
47. Kroll, K., U. K. Decking, K. Dreikorn, and J. Schrader. Rapid turnover of the AMP-adenosine metabolic cycle in the guinea pig heart. *Circ.Res.* 73: 846-856, 1993.

48. Kroll, K., D. J. Kinzie, and L. A. Gustafson. Open-system kinetics of myocardial phosphoenergetics during coronary underperfusion. *Am.J.Physiol* 272: H2563-H2576, 1997.
49. Kroll, K. and G. V. Martin. Comparison of myocardial ATP, blood flow, and cytosolic adenosine in demand ischemia and coronary occlusion. *Am.J.Physiol* 269: H819-H828, 1995.
50. Loh, E., T. R. Rebbeck, P. D. Mahoney, D. DeNofrio, J. L. Swain, and E. W. Holmes. Common variant in AMPD1 gene predicts improved clinical outcome in patients with heart failure. *Circulation* 99: 1422-1425, 1999.
51. Lowry, O. H., et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* (193), 265-275. 1951.
52. Mahnke-Zizelman, D. K. and R. L. Sabina. Cloning of human AMP deaminase isoform E cDNAs. Evidence for a third AMPD gene exhibiting alternatively spliced 5'-exons. *J.Biol.Chem.* 267: 20866-20877, 1992.
53. Mallet, R. T., J. Sun, W. L. Fan, Y. H. Kang, and R. Bunger. Magnesium activated adenosine formation in intact perfused heart: predominance of ecto 5'-nucleotidase during hypermagnesemia. *Biochim.Biophys.Acta* 1290: 165-176, 1996.
54. Masini, E., E. Giannella, S. Bianchi, B. Palmerani, A. Pistelli, and P. F. Mannaioni. Histamine release in acute coronary occlusion-reperfusion in isolated guinea-pig heart. *Agents Actions* 23: 266-269, 1988.

55. Meghji, P., K. M. Middleton, and A. C. Newby. Absolute rates of adenosine formation during ischaemia in rat and pigeon hearts. *Biochem.J.* 249: 695-703, 1988.
56. Morisaki, T., R. L. Sabina, and E. W. Holmes. Adenylate deaminase. A multigene family in humans and rats. *J.Biol.Chem.* 265: 11482-11486, 1990.
57. Nees, S., E. Gerlach, R. C. Des, M. Bock, B. F. Becker, and V. Herzog. [Recent knowledge about the metabolic regulation of coronary circulation, with a contribution on adenine nucleotide metabolism of coronary endothelial cells]. *Z.Kardiol.* 74 Suppl 7: 87-91, 1985.
58. Neumann, J., R. C. Gupta, L. R. Jones, G. S. Bodor, S. Bartel, E. G. Krause, H. T. Pask, W. Schmitz, H. Scholz, and A. M. Watanabe. Interaction of beta-adrenoceptor and adenosine receptor agonists on phosphorylation. Identification of target proteins in mammalian ventricles. *J.Mol.Cell Cardiol.* 27: 1655-1667, 1995.
59. Norton, G. R., A. J. Woodiwiss, R. J. McGinn, M. Lorbar, E. S. Chung, T. W. Honeyman, R. A. Fenton, J. G. Dobson, Jr., and T. E. Meyer. Adenosine A1 receptor-mediated antiadrenergic effects are modulated by A2a receptor activation in rat heart. *Am.J.Physiol* 276: H341-H349, 1999.
60. Ogasawara, N., H. Goto, and T. Watanabe. Isozymes of rat AMP deaminase. *Biochim.Biophys.Acta* 403: 530-537, 1975.
61. Ogasawara, N., H. Goto, Y. Yamada, T. Watanabe, and T. Asano. AMP deaminase isozymes in human tissues. *Biochim.Biophys.Acta* 714: 298-306, 1982.

62. Olsson, R. A., J. A. Snow, and M. K. Gentry. Adenosine metabolism in canine myocardial reactive hyperemia. *Circ.Res.* 42: 358-362, 1978.
63. Perez, N. G., W. D. Gao, and E. Marban. Novel myofilament Ca²⁺-sensitizing property of xanthine oxidase inhibitors. *Circ.Res.* 83: 423-430, 1998.
64. Podzuweit, T., P. Nennstiel, and A. Muller. Isozyme selective inhibition of cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases by erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine. *Cell Signal.* 7: 733-738, 1995.
65. Porter, D. J. and E. Abushanab. Kinetics of inhibition of calf intestinal adenosine deaminase by (+)- and (-)-erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine. *Biochemistry* 31: 8216-8220, 1992.
66. Saavedra, W. F., N. Paolocci, M. E. St John, M. W. Skaf, G. C. Stewart, J. S. Xie, R. W. Harrison, J. Zeichner, D. Mudrick, E. Marban, D. A. Kass, and J. M. Hare. Imbalance between xanthine oxidase and nitric oxide synthase signaling pathways underlies mechanoenergetic uncoupling in the failing heart. *Circ.Res.* 90: 297-304, 2002.
67. Sala-Newby, G. B., N. V. Freeman, A. C. Skladanowski, and A. C. Newby. Distinct roles for recombinant cytosolic 5'-nucleotidase-I and -II in AMP and IMP catabolism in COS-7 and H9c2 rat myoblast cell lines. *J.Biol.Chem.* 275: 11666-11671, 2000.

68. Sala-Newby, G. B., A. C. Skladanowski, and A. C. Newby. The mechanism of adenosine formation in cells. Cloning of cytosolic 5'- nucleotidase-I. *J.Biol.Chem.* 274: 17789-17793, 1999.
69. Sandhu, G. S., A. C. Burrier, and D. R. Janero. Adenosine deaminase inhibitors attenuate ischemic injury and preserve energy balance in isolated guinea pig heart. *Am.J.Physiol* 265: H1249-H1256, 1993.
70. Schaeffer, H. J. and D. Vogel. Enzyme inhibitors. IX. Hydrophobic interactions of some 9-alkyladenines with adenosine deaminase. *J.Med.Chem.* 8: 507-509, 1965.
71. Schwartz, L. M., T. R. Bukowski, J. H. Revkin, and J. B. Bassingthwaite. Cardiac endothelial transport and metabolism of adenosine and inosine. *Am.J.Physiol* 277: H1241-H1251, 1999.
72. Skladanowski, A. C. and A. C. Newby. Partial purification and properties of an AMP-specific soluble 5'- nucleotidase from pigeon heart. *Biochem.J.* 268: 117-122, 1990.
73. Skladanowski, A. C., G. B. Sala, and A. C. Newby. Inhibition of IMP-specific cytosolic 5'-nucleotidase and adenosine formation in rat polymorphonuclear leucocytes by 5'-deoxy-5'- isobutylthio derivatives of adenosine and inosine. *Biochem.J.* 262: 203-208, 1989.
74. Soncul, H., L. Gokgoz, S. Kalaycioglu, V. Sinci, M. Kaptanoglu, and A. Ersoz. Effect of allopurinol on myocardial recovery during reperfusion. *Scand.J.Clin.Lab Invest* 53: 11-15, 1993.

75. Stepp, D. W., R. Van Bibber, K. Kroll, and E. O. Feigl. Quantitative relation between interstitial adenosine concentration and coronary blood flow. *Circ.Res.* 79: 601-610, 1996.
76. Stumpe, T. and J. Schrader. Phosphorylation potential, adenosine formation, and critical PO₂ in stimulated rat cardiomyocytes. *Am.J.Physiol* 273: H756-H766, 1997.
77. Szentmiklosi, A. J., M. Nemeth, A. Cseppento, J. Szegi, J. G. Papp, and L. Szekeres. Potentiation of the myocardial actions of adenosine in the presence of coformycin, a specific inhibitor of adenosine deaminase. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.* 256: 236-252, 1982.
78. Szentmiklosi, A. J., M. Nemeth, A. Cseppento, J. Szegi, J. G. Papp, and L. Szekeres. Effects of hypoxia on the guinea-pig myocardium following inhibition of adenosine deaminase by coformycin. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.* 269: 287-294, 1984.
79. Tavenier, M., A. C. Skladanowski, R. A. De Abreu, and J. W. de Jong. Kinetics of adenylyate metabolism in human and rat myocardium. *Biochim.Biophys.Acta* 1244: 351-356, 1995.
80. Thakkar, J. K., D. R. Janero, H. M. Sharif, D. Hreniuk, and C. Yarwood. Cardiac adenylyate deaminase: molecular, kinetic and regulatory properties under phosphate-free conditions. *Biochem.J.* 300 (Pt 2): 359-363, 1994.

81. Thakkar, J. K., D. R. Janero, C. Yarwood, H. Sharif, and D. Hreniuk. Isolation and characterization of AMP deaminase from mammalian (rabbit) myocardium. *Biochem.J.* 290 (Pt 2): 335-341, 1993.
82. Thakkar, J. K., D. R. Janero, C. Yarwood, and H. M. Sharif. Modulation of mammalian cardiac AMP deaminase by protein kinase C- mediated phosphorylation. *Biochem.J.* 291 (Pt 2): 523-527, 1993.
83. Tune, J. D., K. N. Richmond, M. W. Gorman, and E. O. Feigl. Role of nitric oxide and adenosine in control of coronary blood flow in exercising dogs. *Circulation* 101: 2942-2948, 2000.
84. Tune, J. D., K. N. Richmond, M. W. Gorman, R. A. Olsson, and E. O. Feigl. Adenosine is not responsible for local metabolic control of coronary blood flow in dogs during exercise. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 278: H74-H84, 2000.
85. Van den, B. G., F. Bontemps, and H. G. Hers. Purine catabolism in isolated rat hepatocytes. Influence of coformycin. *Biochem.J.* 188: 913-920, 1980.
86. Wallenstein, S., C. L. Zucker, and J. L. Fleiss. Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res.* 47: 1-9, 1980.
87. Wang, X., H. Morisaki, K. Sermsuvitayawong, I. Mineo, K. Toyama, N. Ogasawara, T. Mukai, and T. Morisaki. Cloning and expression of cDNA encoding heart-type isoform of AMP deaminase. *Gene* 188: 285-290, 1997.

88. Zielke, C. L. and C. H. Suelter. Substrate specificity and aspects of deamination catalyzed by rabbit muscle 5'-adenylic acid aminohydrolase. *J.Biol.Chem.* 246: 1313-1317, 1971.
89. Zimmer, H. G. and E. Gerlach. Stimulation of myocardial adenine nucleotide biosynthesis by pentoses and pentitols. *Pflugers Arch.* 376: 223-227, 1978.
90. Zoref-Shani, E., Y. Bromberg, C. Shirin, Y. Sidi, and O. Sperling. Metabolic fate of hypoxanthine and inosine in cultured cardiomyocytes. *J.Mol.Cell Cardiol.* 24: 183-189, 1992.
91. Zoref-Shani, E., G. Kessler-Icekson, and O. Sperling. Pathways of adenine nucleotide catabolism in primary rat cardiomyocyte cultures. *J.Mol.Cell Cardiol.* 20: 23-33, 1988.
92. Zoref-Shani, E., G. Kessler-Icekson, L. Wasserman, and O. Sperling. Characterization of purine nucleotide metabolism in primary rat cardiomyocyte cultures. *Biochim.Biophys.Acta* 804: 161-168, 1984.
93. Zoref-Shani, E., C. Shirin, Y. Sidi, Y. Bromberg, and O. Sperling. Metabolism of guanine and guanine nucleotides in primary rat cardiomyocyte cultures. *Biochem.Mol.Med.* 55: 149-155, 1995.

6 Zusammenfassung

Die Umsatzrate der AMP-Desaminase im Meerschweinchenherzen

Se-Chan Kim

Im Adenin-Nukleotid-Stoffwechsel spielt die Bildung von Adenosin aus AMP hinsichtlich der kardioprotektiven Wirkung von Adenosin insbesondere in Hypoxie eine bedeutende Rolle. In Normoxie werden aus AMP über die 5'-Nukleotidase $2.1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ Adenosin und in Hypoxie $6.3 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ Adenosin gebildet (Adenosin-Weg). Die AMP-Desaminase vermittelt den Abbau von AMP zu Inosinmonophosphat (IMP) und dann zu Inosin (IMP-Weg). Dieser Stoffwechselweg ist seit längerem bekannt, ohne dass die quantitative Bedeutung dieses Weges insbesondere bei moderater Hypoxie bisher erschlossen wurde. In der vorliegenden Arbeit konnte am isolierten, retrograd perfundierten Meerschweinchenherz nach Langendorff in Normoxie und Hypoxie die Umsatzrate der AMP-Desaminase durch den Einsatz von Inhibitoren der Adenosin-Desaminase und der Xanthin-Oxidase (EHNA, Allopurinol) *in vivo* bestimmt werden. Die Purine Adenosin und Inosin und deren Metabolite wurden im koronarvenösen Effluat mittels HPLC gemessen. In Normoxie (95% O₂) werden $1.8 \text{ nmol AMP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ (n=6) über den IMP-Weg abgebaut. In Hypoxie (40% O₂) kommt es zu einem 4-fachen Anstieg der AMP-Konzentration und einem etwa 4-fachen Anstieg des AMP-Abbaus über den IMP-Weg auf $6.96 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ (n=6). Somit haben der IMP-Weg und der Adenosin-Weg in Normoxie und Hypoxie einen gleich hohen Anteil am Abbau von AMP. Ein hemmender Einsatz der Inhibitoren Coformycin und den Coformycin-Analoga GP 3521 und GP 3449 auf die AMP-Desaminase konnte *in vitro* im myokardialen Enzymextrakt gezeigt werden. Dieser Effekt liess sich *in vivo* aber nicht nachweisen. Ein möglicher Einfluss der Purin-de-novo-Synthese auf die Purinfreisetzung konnte durch Einsatz von Methotrexat ausgeschlossen werden. Die Daten dieser Arbeit zeigen, 1) dass der IMP-Weg quantitativ ebenso bedeutsam ist wie der Adenosin-Weg, und 2) dass die Umsatzrate der AMP-Desaminase substratabhängig ansteigt und damit die AMP-Konzentration für den Abbau von AMP zu IMP entscheidend ist.

Düsseldorf, im März 2003

Priv.-Doz. Dr. med. U. Decking

7 Lebenslauf

Zur Person

Name: Se-Chan Kim
Geburtsdatum/-ort: 31. Dezember 1973 in Bottrop
Familienstand: Ledig
Adresse: Heinrich-von-Kleist-Str. 29, 53113 Bonn

Schulbildung

09/80 - 06/84 Städt. Gemeinschaftsgrundschule Büscherhof, Leichlingen
08/84 - 06/93 Gymnasium Marienschule, Leverkusen-Opladen
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

10/93 - 03/94 Studium der Humanmedizin, Humboldt-Universität Berlin
04/94 - 05/00 Studium der Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
März 1996 Ärztliche Vorprüfung
März 1997 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Oktober 1997 USMLE Step 1
März 1999 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/99 - 11/99 PJ Anästhesiologie, Innere Medizin, Klinikum Krefeld
12/99 - 03/00 PJ-Tertial Chirurgie, Brigham & Women's Hospital und Children's Hospital in Boston, USA
Mai 2000 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Promotion

1996 – 2003 „Die Umsatzrate der AMP-Desaminase im Meerschweinchenherzen“ unter Betreuung von Priv.-Doz. Dr. med. U. Decking

Berufstätigkeit

10/95 - 02/96 und 10/98 - 02/99 Vorpräparant im Makroskopischen Anatomiekurs, Universität Düsseldorf
09/95 - 10/95 Studentische Pflegekraft, Universitätsklinik Düsseldorf
10/95 - 02/98 Tutor für Abdomen- und Schilddrüsen-sonographie, farbkodierte Duplexsonographie und Gastroskopie, Coloskopie, Broncho- und Kniegelenksarthroskopie im Projekt „Anatomie in den bildgebenden Verfahren“
Organisation der Sonographie- und Duplexsonographiekurse
10/97 - 11/99 Gründung und verantwortliche Leitung des Tutoriums
„Problemorientiertes Lernen in der Vorklinik“
seit 10/00 Assistenzarzt an der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Spezielle Intensivmedizin, Uniklinikum Bonn

Bonn, im März 2003

8 Danksagung

Während meines Studiums hatte ich das Glück, einigen wenigen Menschen zu begegnen, die mein Leben nachhaltig beeinflusst haben. Diesen Menschen möchte ich an dieser Stelle danken. Mein herzlichster Dank gilt dabei PD Dr. med. Ulrich Decking für die Überlassung des Themas und die stets umfassende, freundliche und hilfsbereite Betreuung bei der Durchführung der Experimente, die konstruktiven Anregungen bei der Erstellung der Dissertationsschrift und die abschließende Begutachtung. Ihm verdanke ich mein Interesse an der Herz- und Kreislaufphysiologie, was letztlich bei der Wahl der Anästhesiologie als Weiterbildungsfach maßgeblich Einfluss hatte. Sein bewundernswert scharfer Verstand und seine Persönlichkeit sind nach wie vor ein Leitbild für meine gegenwärtige wissenschaftliche Tätigkeit.

Prof. Dr. med Jürgen Schrader danke ich für die Ermöglichung der Experimente im Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie.

Bei Dr. rer. nat. Thomas Stumpe möchte ich mich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit und insbesondere für die Durchführung bei der Bestimmung von GP 3521 in isolierten Kardiomyozyten bedanken.

Frau Eva Bergschneider danke ich für die umfassende Einarbeitung in die HPLC-Methodik und ihre stets wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Herrn Prof. Dr. med. Hans-Georg Hartwig danke ich dafür, dass er immer ein offenes Ohr für meine studentischen Belange hatte und mich stets in meinen Interessen unterstützte.

Schließlich möchte ich meiner Mutter, meiner Schwester, Katta und Günter danken, die mich in allen Phasen der Promotion motiviert und voller Rücksichtnahme und Liebe unterstützt haben. Ohne ihre Hilfe wäre die Fertigstellung der Dissertationsschrift nicht möglich gewesen.