

**Charakterisierung der transmembranen Wasserkanalproteine  
(Aquaporine) am Beispiel des Säugermyokards:  
Regulatoren des Wassertransportes in Kardiomyozyten**

**Inaugural-Dissertation**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**vorgelegt von**

**Calvo Sanchez; David**

**aus Madrid (Spanien)**

**Juni 2006**

Aus der Klinik für Kardiovaskuläre- und Thoraxchirurgie  
Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie und  
dem Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und Parasitologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Heinz Mehlhorn  
Koreferent: Prof. Dr. Jochen D. Schipke  
Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2006

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Respirationswasser</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2</b>	<b>Regulation des Zellvolumens</b> .....	<b>5</b>
<b>1.3</b>	<b>Myokardiale ischämische Präkonditionierung</b> .....	<b>5</b>
<b>1.4</b>	<b>Einfluss der Proteinkinase-C (PKC) auf die AQP-Expression</b> .....	<b>7</b>
<b>1.5</b>	<b>Genexpression der Wasserkanalproteine</b> .....	<b>8</b>
<b>1.6</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>8</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Biologisches Material</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2</b>	<b>Kit-Systeme</b> .....	<b>11</b>
<b>2.3</b>	<b>Antikörper</b> .....	<b>12</b>
<b>2.4</b>	<b>Primer</b> .....	<b>12</b>
<b>2.5</b>	<b>Molekulargewichtsstandards</b> .....	<b>13</b>
<b>2.6</b>	<b>Plasmide</b> .....	<b>14</b>
<b>2.7</b>	<b>Restriktionsenzyme</b> .....	<b>14</b>
<b>2.8</b>	<b>Antibiotika</b> .....	<b>14</b>
<b>2.9</b>	<b>Weitere Reagenzien</b> .....	<b>14</b>
<b>2.10</b>	<b>Lösungen und Puffer</b> .....	<b>15</b>
	2.10.1 Medien .....	15
	2.10.2 Gele .....	16
	2.10.3 Puffer.....	17
<b>2.11</b>	<b>Zelluläre-Methoden</b> .....	<b>19</b>
	2.11.1 Silikonisieren von Glaswaren .....	19
	2.11.2 Isolierung adulter ventrikulärer Kaninchen-Kardiomyozyten.....	20
	2.11.3 Präparation und Aufschluss der Kardiomyozyten.....	20
	2.11.4 Qualitätskontrolle der Zellisolate .....	21
	2.11.5 Primärkulturen .....	21
	2.11.6 Inkubation isolierter Kardiomyozyten.....	22
	2.11.7 Laminin Beschichtung .....	24
	2.11.8 Pharmakologische Induktion der Primärkultur .....	24
	2.11.9 Passagieren der kardialen Primärkulturen.....	25

<b>2.12</b>	<b>Biochemische Methoden</b>	<b>25</b>
2.12.1	Lyse des Herzgewebes	25
2.12.2	Subzelluläre Fraktionierung des Ventrikelgewebes	25
2.12.3	Präparation der Rohmembran-Fractionen	26
2.12.4	Proteinbestimmung	26
2.12.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	26
2.12.6	Transfer der Proteine (Western-Blotting)	27
2.12.7	Färbetechniken	27
2.12.8	Immundetektion	28
2.12.9	Detektion mit verstärkter Chemilumineszenz (ECL)	28
2.12.10	Strippen von Membranen	28
2.12.11	Präsentation der Daten und Statistik	29
<b>2.13</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>29</b>
2.13.1	Direkte Probenentnahme und Transport	29
2.13.2	Isolierung von Ribo-Nukleinsäuren	29
2.13.3	Elektrophoretische Trennung von RNS	30
2.13.4	Elektrophoretische Trennung von DNS	30
2.13.5	Nukleinsäuren-Konzentrationsbestimmung	31
2.13.6	copy DNS-Synthese	31
2.13.7	PCR Bedingungen	32
2.13.8	Primer-gerichtete-Fragmentierung der cDNS	32
2.13.9	Ligation	33
2.13.10	Herstellung kompetenter Bakterien	33
2.13.11	Transformation von E. coli	34
2.13.12	Präparation im Kleinmaßstab (Minipräp)	34
2.13.13	Restriktionsverdau	35
2.13.14	Glyzerinkultur	35
2.13.15	DNS-Sequenzierung	35
2.13.16	In vitro Transkription und Sonde für Northern Blot	36
2.13.17	Northern-Blot-Analyse	36
2.13.18	Hybridisierung der Membran	37
2.13.19	Detektion der Sonde auf der Membran	37
2.13.20	Auswertung der Sonden	37
<b>2.14</b>	<b>Mikroskopische Methoden</b>	<b>38</b>
2.14.1	Fixierung isolierter Kardiomyozyten	38
2.14.2	Lichtmikroskopie	38
2.14.3	Elektronenmikroskopie	38
2.14.4	Fixierung, Entwässerung und Einbettung der Proben	38
2.14.5	Herstellung der Schnitte	39
2.14.6	Immunfluoreszenzfärbung kultivierter Kardiomyozyten	39
2.14.7	Konfokale Laserscanmikroskopie	40

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b>Kardiomyozyten-Charakterisierung</b> .....	<b>41</b>
	3.1.1 Vitalität und Energiezustand isolierter Kardiomyozyten.....	41
	3.1.2 Ca <sup>+</sup> -Toleranz isolierter Kaninchen-Kardiomyozyten .....	43
	3.1.3 Morphologie.....	43
	3.1.4 Vitalität und Energiezustand kultivierter Kardiomyozyten .....	44
<b>3.2</b>	<b>Charakterisierung der Membran-Fraktionen</b> .....	<b>45</b>
	3.2.1 Plasmamembran-Fraktion .....	46
	3.2.2 Mikrosomale-Membran-Fraktion.....	46
<b>3.3</b>	<b>Expression der Ouabain-sensitiven Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase</b> .....	<b>46</b>
<b>3.4</b>	<b>Expression von AQP1 und pharmakologische Induktion</b> .....	<b>47</b>
<b>3.5</b>	<b>Expression von AQP4 und pharmakologische Induktion</b> .....	<b>51</b>
<b>3.6</b>	<b>Effekte der Proteinkinase-C (PKC) auf die kardiale AQP-Expression</b> .....	<b>54</b>
	3.6.1 Effekte der PKC auf die AQP1-Expression .....	54
	3.6.2 Effekte der PKC auf die AQP4-Expression .....	55
<b>3.7</b>	<b>Reinheitsanalyse der Gesamt-RNS</b> .....	<b>56</b>
<b>3.8</b>	<b>Primer-gerichtete Fragmentierung der cDNS</b> .....	<b>57</b>
<b>3.9</b>	<b>Fragmentgrößen</b> .....	<b>60</b>
<b>3.10</b>	<b>Klonierung der AQP4-Fragmente</b> .....	<b>65</b>
<b>3.11</b>	<b>Sequenzanalyse</b> .....	<b>65</b>
<b>3.14</b>	<b>Northern Blots (Hybridisierung)</b> .....	<b>73</b>
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>75</b>
<b>4.1</b>	<b>Isolierte Herzmuskelzellen als biologisches Modell</b> .....	<b>75</b>
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung von Kaninchen-Kardiomyozyten mit stabiler AQP-Expression</b> .....	<b>77</b>
<b>4.3</b>	<b>Translokation und Lokalisation der AQPs in Kardiomyozyten</b>	<b>78</b>
<b>4.4</b>	<b>Bedeutung der mitochondrialen ATP-abhängigen Kalium-Kanäle</b> .....	<b>80</b>
<b>4.5</b>	<b>Regulation der AQP-Protein-Expression durch die Proteinkinase-C</b> .....	<b>82</b>
<b>4.6</b>	<b>AQP4-Isoformen</b> .....	<b>86</b>
	4.6.1 Orthogonal arrays of particles (OAPs).....	91
<b>4.7</b>	<b>AQP-Knockout-Mäuse</b> .....	<b>94</b>
<b>4.8</b>	<b>Das mRNS-AQP4-Transkript</b> .....	<b>96</b>
<b>4.9</b>	<b>Zell-und Organschwellung <i>in vivo</i></b> .....	<b>96</b>

<b>5.</b>	<b>Klinische Bedeutung.....</b>	<b>99</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>101</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>103</b>
	Abbildungsverzeichnis.....	103
	Tabellenverzeichnis.....	104
	Abkürzungen .....	105
<b>8.</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>108</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>127</b>
	<b>Erklärung .....</b>	<b>129</b>

## 1. Einleitung

Wasser ist für die Funktion von Zellen und Organen in allen biologischen Organismen von zentraler Bedeutung. Ungeachtet ihrer fundamentalen Bedeutung sind die Mechanismen des Wassertransportes durch biologische Membranen, Zellen und Epithelien nicht vollständig geklärt. Nach gültiger Lehrmeinung wird der Wassertransport von einem transepithelialen osmotischen Gradienten getrieben (Spring, 1999).

Die Zelle verfügt über eine Fülle von regulativen Mechanismen, die der Aufrechterhaltung der Elektrolyt- und Wasserbalance dienen. So ermöglichen z.B. Signaltransduktionskaskaden die Adaption der Zelle an einen veränderten osmotischen Druck (Droillard et al., 2000). Unter anderem können mechanosensitive Kanäle eine Umwandlung eines osmotischen Signals in ein elektrisches Signal vornehmen (Oliet and Bourque, 1993).

Nach jahrzehntelangen Untersuchungen sind die Auffassungen über die Wege des Wassertransportes kontrovers. Entweder passiert Wasser die Membran-Lipiddoppelschicht unmittelbar (Paula et al., 1996; Paula et al., 1998), oder es nutzt transmembranäre Poren (Jansen and Blume, 1995). Alternativ soll eine molekulare Wasserpumpe in einer Art Mikropinozytose Wasser auch gegen den osmotischen Gradienten transportieren. An diese Pumpe sollen Transportproteine, z.B. spezifische Na<sup>+</sup>-Glukose-Cotransporter, den Wassertransport mit dem Transport anderer Substanzen koppeln (Loo et al., 1999). Es wurde allerdings angezweifelt, ob die erforderlichen Transportvolumina auf diesem Weg oder über die Diffusion zu realisieren seien (Spring, 1999).

Schon in den fünfziger Jahren vermutete man selektive Kanäle, über welche Wassermoleküle ohne Diffusion schnell und spezifisch in die Zelle eindringen konnten. Ein derart erleichterter Durchtritt durch biologische Membranen wurde für Erythrozyten, Nierentubuli und Urinblasen von Amphibien beschrieben (Macey, 1984; Meyer and Verkman, 1987; Verkman et al., 1989). Es blieb aber ungeklärt, ob es sich um spezifische oder unspezifische Wasserkanäle handelt. Erst 1988 isolierte Peter Agre von der Johns Hopkins University in Baltimore in der Zellmembran roter Blutkörperchen ein Protein, das eine Rolle beim Wassertransport spielen könnte. Spätere Arbeiten (Zhang et al., 1991) zeigten, dass die Wasserpermeabilität in *Xenopus*oozyten anstieg, wenn diese eine heterologe mRNS aus Nieren, Retikulozyten und Urinblasen von Amphibien exprimierten. Dieser erste Hinweis auf das Vorhandensein spezifischer Wasserkanäle wurde durch die Analyse eines 30 kDa Wasserkanals in Erythrozyten und an den Membranen proximaler Tubuli bestätigt (van Hoek et al., 1990; van Hoek et al., 1991).

Dennoch blieb der Wassertransport durch Wasserkanäle hinsichtlich eines Cotransports von Ionen umstritten (Yool et al., 1996; Weaver et al., 1994).

Das humane 28 kDa „channel-forming-integral-protein“ (CHIP28) wurde erstmals im Jahr 1991 kloniert (Preston and Agre, 1991). Xenopusoozyten, die den Wasserkanal CHIP 28 exprimierten, wiesen eine höhere Wasserpermeabilität auf (Preston et al., 1992). Da dieser Kanal porig und für den Durchfluss von Wasser wichtig war, erhielt er den Namen Aquaporin (AQP).

Inzwischen sind die unterschiedlichsten AQPs von Bakterien, Pflanzen und Tieren bekannt. Im Säugetier existieren mindestens elf verschiedene Varianten. Aufgrund der großen Homologien in den Aminosäuresequenzen wurden die AQPs zu einer Familie zusammengefasst. Die funktionelle Einteilung erfolgte in zwei Gruppen:

- a) reine Wasserporen (AQP-0,-1,-2,-4,-5,-6,-8) (= permselektive Wasserkanäle) und
- b) Poren, die neben Wasser auch kleine ungeladene Moleküle wie Glycerol und Harnstoff passieren lassen (AQP-3,-7,-9,-10) (Lee et al., 1997; Connolly et al., 1998; Murata et al., 2000; Agre et al., 2002).

Zu den neueren Aspekten der Aquaporin-Funktion gehört, dass CO<sub>2</sub> den Wasserkanal AQP1 und Chlorid- und Nitrat-Anionen den Wasserkanal AQP6 passieren können (Ikeda et al., 2002; Frigeri et al., 1995a).

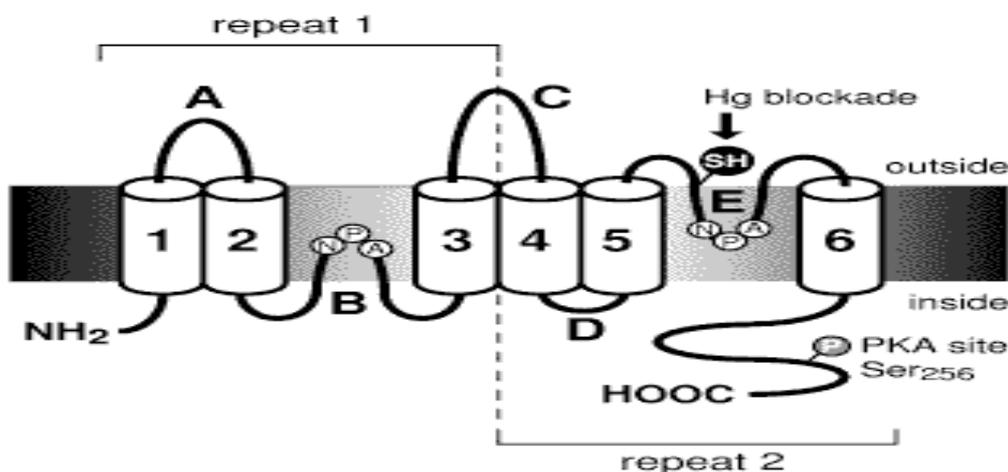
Erste Strukturmodelle von Wasserkanälen wurden im Jahr 1999 beschrieben. Obwohl diese Kanäle so feinporig sind, dass nur eine Kette einzelner Wassermoleküle hindurchgelangt, erreichen Aquaporine die erstaunlich hohe Wasserleitfähigkeit von bis zu drei Milliarden Molekülen pro Sekunde und Kanal (Agre et al., 1999). Eine 10 x 10 cm große Membran mit eingebetteten Aquaporinen könnte somit etwa einen Liter Wasser in wenigen Sekunden filtern und entsalzen (de Groot et al., 2001).

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen und durch Röntgenstrukturanalysen wurde die Struktur des Proteins aufgeklärt (Murata et al., 2000). Das Protein bildet in der Zellmembran einen 2 nm langen und an der engsten Stelle einen nur 0,3 nm breiten Kanal; für ein einzelnes Wassermolekül gerade groß genug (de Groot et al., 2001; Sui et al., 2001).

Hydrophathieplots der Aminosäuresequenz der Aquaporine (Hasegawa et al., 1994b; Jung et al., 1994a) ließen auf ein Protein mit einer 6-Transmembran-Region sowie auf intrazelluläre N- und C-Termini und zwei „tandem-repeats-Regionen“ schließen. In deren

Sequenz befinden sich jeweils vier Membran-umspannende Segmente, die den Amino- und Carboxy-terminalen Hälften des Proteins entsprechen (Shi et al., 1995). Jede Hälfte enthält eine für Aquaporine typische, hoch konservierte NPA-Region (Asparagin-Prolin-Alanin), die von anderen konservierten Resten innerhalb zweier hydrophober Domänen flankiert wird (Jung et al., 1994b; Lee et al., 1997; Mathai and Agre, 1999).

Durch die Aminosäure Cystein an der Stelle 189 am Protein sind AQPs gegenüber Quecksilber sensitiv (Hasegawa et al., 1994b; Zeidel et al., 1992; Jung et al., 1994b). Sie lassen sich also mit Quecksilber inhibieren. Als „Mercurial Insensitive Water Channel“ (MIWC) oder AQP4 wurde der erste Kanal bezeichnet, der Quecksilber-unempfindlich war und ausschließlich Wasser transportierte. Das Überlappen von Domänen der Schleifen B und E (Abb. 1) bildet den Weg für die Passage von Wassermolekülen: das so genannte „Stundenglas-Modell“. Die Assoziation von AQP1 in nichtkovalent verbundene Tetramere mit einer Glykolisierung einer der vier Untereinheiten wurde durch Sedimentation und Lektin-Chromatografie bewiesen (Jung et al., 1994b; Agre et al., 1999). Es handelt sich um hydrophobe, antiparallel angeordnete und die gesamte Membran durchquerende Alpha-helices, die zusammen ein funktionstüchtiges Monomer mit zentralem Wasserkanal bilden (Katsura et al., 1995).



**Abb. 1: Strukturmodell von AQP1** (Mathai and Agre, 1999)

## 1.1 Respirationswasser

Die Funktionen eines Organismus und seines Stoffwechsels hängen von der ständigen Zufuhr von Sauerstoff und dem Abtransport von Kohlendioxid ab. Dies ist nur durch einen ungestörten Blutkreislauf möglich, welcher durch das Herz aufrechterhalten wird.

Pathologische Veränderungen des Herzens (z.B. Arteriosklerose) sind für Kreislaufstörungen verantwortlich.

Für die Regulation des Energiestoffwechsels im Myokard ist eine Vielzahl von Faktoren verantwortlich. Den Transport von Energie und wichtigen Botenstoffen zu den Organen übernimmt das Blut. Die Versorgung des Herzmuskels selbst geschieht über die Koronardurchblutung und regional durch den myokardialen Blutfluss (MBF). Der MBF variiert in verschiedenen Bereichen des Säugetierherzens zwischen 20 % und 200 % (King et al., 1985). Da ein MBF von nur 20 % nicht durch einen Anstieg der arterio-venösen Sauerstoffdifferenz kompensiert werden kann, müssten derartige 'Niederflussareale' nekrotisch werden. Daher sollte der Stoffwechsel in Niederflussarealen niedrig sein. Andererseits ist zu vermuten, dass er in Hochflussarealen hoch sein sollte. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an Langendorff-blutperfundierten, isolierten Kaninchenherzen ergaben eine signifikante Korrelation zwischen MBF und regionalem oxidativen Stoffwechsel. Dabei wurde durch  $^{18}\text{O}_2$ -Markierung des Respirationswassers eine qualitative Aussage über den oxidativen Stoffwechsel erzielt (Schipke et al., 1998; Schwanke et al., 2000).

In 'Hochflussarealen' und bei regulärer Zellatmung eines Organismus mit hohem norm-oxischem oxidativen Stoffwechsel fällt bei der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien viel Respirationswasser an (Deussen and Bassingthwaite, 1996). Dieses Wasser muss durch die äußere Mitochondrienmembran und durch die Membranen der Kardiomyozyten und der Endothelzellen transportiert werden.

Es wurde postuliert, dass für den myokardialen Wassertransport die Aquaporine verantwortlich sind. In Arealen mit hohem Stoffwechsel und hoher Respirationswasser-Produktion sollte dann die AQP-Expression hoch sein. Tatsächlich haben wir mit dem SDS-PAGE-Verfahren in humanen Myokard-Gewebeproben und in Kaninchen-Myokard-Gewebeproben eine unterschiedliche AQP1-Protein-Expression für den rechten und den linken Ventrikel ermittelt (Birkenkamp-Demtröder et al., 2003).

Des Weiteren wurde postuliert, dass AQP4 als permselektiver effizienter Wasserkanal am Wassertransport involviert ist. Eine Fluss- und Stoffwechselheterogenität an definierten Stellen des Myokards konnte jedoch nicht gleichzeitig gemessen werden. Die Regionen der Heterogenität im Myokard sind nicht ohne weiteres zu identifizieren. Zusätzlich verschiebt sich das Heterogenitätsmuster in Abhängigkeit von der Zeit.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, wo AQP1 im Myokard zellulär exprimiert wird. Auch sollte die Existenz weiterer Aquaporine an Kaninchen-Kardiomyozyten und im humanen Myokard (Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie) untersucht werden. Des Weiteren sollte die Lokalisation der Aquaporine beschrieben und visualisiert werden.

## **1.2 Regulation des Zellvolumens**

Osmotische Gradienten führen zu Volumenänderungen der Kardiomyozyten und damit des Herzmuskels. Bisher wurde die Permeabilität des Sarkolems nicht genau bestimmt, und somit ist auch der Mechanismus des Wasserein- und -austritts unklar (Suleymanian and Baumgarten, 1996). Das Zellvolumen verändert sich ebenfalls bei metabolischer Aktivität, Proteolyse und Glykolyse sowie während des Zellzyklus, bei Sekretion und Muskelaktivität. Unter pathophysiologischen Bedingungen verändert sich das Zellvolumen bei Ischämie, Azidose und im Rahmen von chronischen Stoffwechselstörungen wie z.B. bei einer Hyperglykämie (McManus et al., 1995; Parker, 1993). Einige Zellen, z.B. Endothelzellen, reagieren nach initialer Schrumpfung durch eine Erhöhung der Tonizität des extrazellulären Mediums mit einer regulatorischen Erhöhung des Zellvolumens (Banderali and Roy, 1992). Wasser muss also in die Zelle gelangen.

Es stellt sich die zusätzliche Frage, ob es bei isolierten Kardiomyozyten nach Beeinflussung des Stoffwechsels zu einer Einlagerung von Wasser kommt, und wie die Aquaporine an diesen Prozess beteiligt sind.

## **1.3 Myokardiale ischämische Präkonditionierung**

Bei einer Ischämie ist das Zellvolumen pathophysiologisch verändert. Eine ischämische Präkonditionierung (IP) bedeutet, dass eine kurzfristige Ischämie die Toleranz gegenüber einer langandauernden Ischämie (= Indexischämie) erhöht (Murry et al., 1986). Daher war nach IP und nachfolgender Okklusion eines Koronargefäßes die Infarktgröße vermindert. Protektive Effekte der IP wurden in verschiedenen Organen wie Herz, Leber, Niere, Skelettmuskel und Nervengewebe nachgewiesen (Cochrane et al., 1999). Die Verkleinerung der Infarktareale, aber auch die zelluläre Protektion der ischämischen

Randzone, verursachen am Herzen funktionelle Verbesserungen (Murry et al., 1986; Jennings et al., 1991; Wolfe et al., 1993; Walker et al., 1993; Peralta et al., 1999).

Die molekularen Hintergründe der IP sind bisher nicht vollständig charakterisiert. Bekannt ist, dass das Ausmaß der IP Organ-, Spezies- und Alters-abhängig ist.

Nach einer ersten Phase der Protektion (Intervall zwischen Reperfusion und Insult) öffnet sich beim Myokard nach 24 – 72 h ein „second window of protection“. Die späte IP kann durch Blockade eines Adenosinrezeptors (Auchampach and Gross, 1993) oder durch einen Blocker der Proteinkinase-C (Cheleritrine) gehemmt werden. Ob jedoch Proteinkinasen in den Protektions eingreifen, ist derzeit unklar (Hu et al., 1999; Okubo et al., 2003; Chou and Messing, 2005; Um et al., 2005).

Mitochondriale ATP-sensitive- $K^+$ -Kanäle ( $_{\text{mito}}K_{\text{ATP}}$ ) werden als Effektoren der IP angesehen, ohne dass der genaue molekulare Mechanismus bisher geklärt wäre (Baines et al., 1999; Walsh et al., 1994; Uchiyama et al., 2003; Zaugg and Schaub, 2003).

Eine dritte Frage bestand darin, ob sich isolierte Kaninchen-Kardiomyozyten pharmakologisch präkonditionieren lassen, und ob sich die Expression der Wasserkanalproteine dabei verändert.

**Kanalaktivatoren.** Nach ihrer Entdeckung im Säugermuskard im Jahre 1988 (Ashcroft et al., 1988) wurde rasch die Bedeutung der  $K_{\text{ATP}}$ -Kanäle für die ischämische Präkonditionierung klar (Walsh et al., 1994; Tomai et al., 1994). Entscheidend für die Signaltransduktion ist, dass die Höhe des Ruhemembranpotenzials durch die Offen-Wahrscheinlichkeit der  $K^+$ -Kanäle in den Membranen (mitochondriale- und Plasma-Membran) bestimmt wird (Quast and Cook, 1989b; Liu et al., 1996). Steigt die Offen-Wahrscheinlichkeit, wird das Ruhemembranpotenzial in Richtung auf das  $K^+$ -Gleichgewichtspotenzial verschoben. Die Membran hyperpolarisiert, und der über die spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanäle vermittelte  $Ca^{2+}$ -Einstrom verringert sich (Murata et al., 2001).

Eine chemisch heterogene Gruppe von Stoffen, denen die Fähigkeit gemeinsam ist, die Öffnungswahrscheinlichkeit der  $_{\text{mito}}K_{\text{ATP}}$ -Kanäle zu erhöhen, wird als  $K^+$ -Kanalöffner ( $K^+$ -Aktivatoren) bezeichnet. In der glatten Muskulatur arterieller Blutgefäße ist die Wirkung besonders ausgeprägt und führt dort zur Vasorelaxation (Quast and Cook, 1989a; Murata et al., 2001). Im Myokard sorgen die  $K^+$ -Aktivatoren durch Verkürzung des Aktionspotenzials zu einer pro- oder antiarrhythmischen Wirkung (Liu et al., 1996). Bereits in der Klinik verwendete  $K^+$ -Kanalöffner sind Benzothiadiazin (= Diazoxid), Pyrimidin (= Minoxidil) und Cyanoguanidin (= Pinacidil). Diazoxid ist besonders interessant, weil es

ein spezieller  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanal-Öffner ist und die Membran hyperpolarisiert (Sato et al., 2000b).

Die Wirkung der  $\text{K}^+$ -Aktivatoren auf die Kanäle ist experimentell durch Substanzen aus der Gruppe der Sulfonylharnstoffe (z.B. Glibenclamide) antagonisierbar (Tomai et al., 1994). Diese Substanzen sind spezifische Blocker der  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanäle (Grover et al., 1990). Schon kleine  $\text{K}^+$ -Aktivator-Dosen, die kaum hämodynamische Wirkungen haben, scheinen das Myokard vor Ischämie-Schäden zu schützen, weil im ischämischen Myokard ein Absinken des intrazellulären ATP-Gehaltes zum Öffnen der  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanäle führt. Dadurch erfolgt eine Verkürzung des Aktionspotenzials, wodurch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom verringert und die Kontraktionskraft vermindert wird. Dieser Vorgang erspart der Zelle Energie und verlängert so ihr strukturelles Überleben. Da die Wirksamkeit der  $\text{K}^+$ -Kanalöffner umgekehrt proportional zur intrazellulären ATP-Konzentration ist, reichen schon geringe Konzentrationen aus, um die  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanäle im ischämischen Bereich zu öffnen (Grover et al., 1992; Van Winkle et al., 1994; Liu et al., 1996; Wang et al., 1999; Sato et al., 2000a; Murata et al., 2001; Hanley et al., 2002; Moses et al., 2005).

#### **1.4 Einfluss der Proteinkinase-C (PKC) auf die AQP-Expression**

Etwa 3 % der Gene des menschlichen Genoms kodieren für Proteinkinasen. Diese sind wichtige Überträger von Signalen zwischen und innerhalb der Zellen und regulieren Zellwachstum, -wanderung, -differenzierung und -transformation sowie die Apoptose, den programmierten Zelltod.

Die Phosphorylierung von Proteinen durch Proteinkinasen ist für die Regulierung von Zellfunktionen und von interzellulären Reaktionen wichtig (Krebs and Beavo, 1979; Lindberg et al., 1992; Cohen, 2000). Die PKC hat einen regulatorischen Einfluss auf die mitochondrialen-ATP-abhängigen- $\text{K}^+$ -Kanäle (de Weille et al., 1989a; de Weille et al., 1989b; Dunne, 1994; Light et al., 1995; Kane et al., 1996; Chou et al., 1998; Hu et al., 1996). Die durch Proteinkinasen eingeführten Phosphatgruppen verändern die biologischen Eigenschaften von Proteinen. Aquaporine weisen je nach Wasserkanaltyp eine bis mehrere Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen auf (Abb. 1). Bei einer Vielzahl von Erkrankungen, wie z.B. bei kardiovaskulären und neurologischen Erkrankungen und insbesondere bei Tumoren, sind die Proteinkinasen fehlerhaft oder nicht adäquat aktiviert (Krebs and Beavo, 1979; Brewster et al., 1993; de Weille et al., 1989b; Brewster et al., 1993; Kuwahara et al., 1995; Barancik et al., 2000). Proteinkinasen sind daher ein bevorzugtes

Target für die Entwicklung neuer Medikamente (van Balkom et al., 2002; Ravingerova et al., 2003; Murphy and Frishman, 2005). Darüberhinaus ist die PKC an Präkonditionierungs-Vorgängen beteiligt (Hu et al., 1999; Okubo et al., 2003; Chou and Messing, 2005; Um et al., 2005).

Dadurch ergeben sich weitere Fragen. Sind biologische Eigenschaften isolierter Kardiomyozyten nach Aktivierung oder Inhibierung der PKC verändert? Gibt es katalytische Eigenschaften der Proteinkinasen an Kardiomyozyten, die sich auf die Expression der Aquaporine auswirken? Lassen sich modifizierte Zustände an den Wasserkanälen durch Phosphorylierungen mittels Proteinkinasen identifizieren?

### **1.5 Genexpression der Wasserkanalproteine**

Die Zelle – und somit jedes Organ – besitzt die Fähigkeit, den Stoffwechsel an Veränderungen der Umwelt (z.B. Temperatur, Nährstoffquellen und Wasser) anzupassen. Je nach vorliegenden Bedingungen wird zeitweise nur ein gewisser Anteil an Proteinen benötigt, um den Stoffwechsel aufrechtzuhalten. Um zu gewährleisten, dass nur Proteine gebildet werden, für die ein physiologischer Bedarf besteht, verfügt die Zelle über regulatorische Mechanismen. Diese Regulation der Genexpression kann auf verschiedenen Ebenen stattfinden. Auf der Ebene der Transkriptionsinitiation kann sie z.B. durch unterschiedliche Promoterstärken und den Grad der Superhelikalität im Promoter-Bereich reguliert werden, sowie durch DNS-bindende-Proteine, welche als Aktivatoren oder Repressoren den Zugang zu der RNS-Polymerase modulieren (Alberts et al., 1995).

Es stellt sich die Frage, wie die im Säugetiermyokard exprimierten Aquaporine in Abhängigkeit metabolischer Veränderungen reagieren. Führen pharmakologische Induktionen zu einer veränderten Genexpression? Wie unterscheiden sich humane und Kaninchen-Kardiomyozyten in Bezug auf die Aquaporin-Genexpression? Wie groß ist das für AQP4-kodierende RNS-Transkript beim Kaninchen?

### **1.6 Zielsetzung**

Um die Pathophysiologie der Herzmuskelzelle zu verstehen und um Veränderungen nach Myokardinfarkten besser erklären zu können, wurden Versuche auf zellulärer Ebene durchgeführt.

Ein insuffizientes Herz kann seinen beiden Aufgaben -ein ausreichendes Volumen fördern und dabei einen ausreichenden Druck aufbauen- nicht nachkommen. Auf molekularer Ebene kommt es zu einer Aktivierung verschiedener Gene und dadurch zu einem veränderten Phänotyp der hypertrophen Kardiomyozyten (Chien et al., 1991). Störungen des kontraktile Apparates, Beeinträchtigung der Mitochondrien und des Energiestoffwechsels bei einer Minderversorgung von ischämisch geschädigten Myokardarealen führen ebenfalls zu Veränderungen auf molekularer Ebene. Ein wichtiges Kennzeichen ist eine gestörte  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase der Myozyten (Carre et al., 1993).

Hochvitale Kardiomyozyten wurden aus dem Kaninchen-Myokard (*Cuniculus spec.*) isoliert und dienten als biologisches Modell. Es war ein Ziel, an diesem Modell metabolische und pharmakologische AQP-Expressions-Veränderungen darzustellen.

Zunächst sollten durch Proteinauflösungen (SDS-PAGE) die beteiligten Wasserkanalproteine identifiziert werden, die als Parameter metabolischer Prozesse bei Veränderungen des zellulären Wasserhaushaltes fungieren. Zur Klärung der Wirkung einer pharmakologisch induzierten 'Ischämie' und einer pharmakologischen Präkonditionierung am Modell isolierter Kardiomyozyten sollte der Einfluss auf die AQP-Expression ermittelt werden. Zusätzlich sollte eine mögliche Membran-Translokation -von der mikrosomalen Membran zur Plasmamembran- der AQPs ermittelt werden.

Ebenso sollte die Wirkung der aktivierten Proteinkinase-C (PKC), durch Phorbolester und geeignete PKC-Inhibitoren, auf die AQP-Expression an Kardiomyozyten ermittelt werden. Hintergrund war der durch die pharmakologische Präkonditionierung veränderte zelluläre Stoffwechsel und das dabei entstandene Respirationswasser. Durch die Inhibition der Zellatmung sollte eine pharmakologische 'Ischämie' in den Zellen induziert werden. Die Befunde sollten sowohl auf molekularer als auch auf morphologischer Ebene erhoben werden. Durch degenerative Primer sollte über PCR und mit cDNA-Banken die Präsenz der analysierten Wasserkanalproteine untersucht werden. Auch sollten die Expressionsstärke und der Expressionsort bei humanen- und Kaninchen-Proben auf Unterschiede untersucht werden.

Humane Proben stammten aus explantierten Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie. Mögliche Phosphorylierungs-Zustände sowie das Vorkommen von Isoformen sollten ebenfalls untersucht werden; Bisher ist die Größe der mRNA für die Wasserkanalproteine und die Genexpressionsrate am Kaninchen nicht bekannt.

Über die Ergebnisse sollten die Folgen einer Minderversorgung der Kardiomyozyten sowohl auf zellulärer als auch auf molekularer Ebene besser zu verstehen sein. Zur Klärung der veränderten Prozesse dienen die verschiedenen Expressionen der myokardialen Aquaporine.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Biologisches Material

Adulte humane DCM-Ventrikel-Biopsien	Unit of Pharmacology and Therapeutics University of Louvain Medical School 53 Avenue Monier B-1200 Brussels
Juvenile humane Ventrikel-Biopsien	Herz- und Diabeteszentrum NRW Georgstrasse 11 D-32545 Bad Oeynhausen
New Zealand White Kaninchen	Tierversuchsanstalt Düsseldorf Universitätstrasse 1 D-40225 Düsseldorf

TOP 10F`-*E. coli* kompetente Zellen Invitrogen, Eggenstein

Genotyp: F` (lacI<sub>q</sub>, Tn10 (Tet<sup>R</sup>) mrcA Δ(mrr-hsdRMS-mrcBC) Φ80LacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(araAleu) 7697 galU galK rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1

INV αF` - *E. coli* kompetente Zellen Invitrogen, Eggenstein

Genotyp: F` endA1 recA1 hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 Φ80lacZΔM15 Δ (lacZYA-argF) U169

### 2.2 Kit-Systeme

ABC-Immunokit	Santa Cruz Biolabs, Heidelberg
Dig Labelling Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Dig Northern Starter Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
ECL Western Blotting detection reagents	Amersham Pharmacia, Freiburg
First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Plasmid Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RT-PCR Synthesis Kit	Amersham Pharmacia, Freiburg
TOPO-TA-Cloning Kit	Invitrogen, Eggenstein
Taq Polymerase Kit	Qiagen, Hilden

## 2.3 Antikörper

### Erstantikörper

Anti-Aquaporin 1 rabbit polyclonal IgG	alomone labs, Israel
Anti-Aquaporin 4 rabbit polyclonal IgG	alomone labs, Israel
Anti Aquaporin 1 goat polyclonal IgG	Santa Cruz Biolabs, Heidelberg
Anti Aquaporin 4 goat polyclonal IgG	Santa Cruz Biolabs, Heidelberg
Anti- Aquaporin 4 mouse polyclonal IgG	Chemicon, Southampton
Anti- Na <sup>+</sup> / K <sup>+</sup> -ATPase α-1	
mouse monoclonal IgG Clone-C	Upstate Biotechnology, Hamburg
Goat ABC Staining System (sc-2023)	Santa Cruz Biolabs, Heidelberg

### Zweitantikörper

Donkey anti goat IgG-Biotin	Santa Cruz Biolabs, Heidelberg
Donkey anti goat IgG-HRP	Santa Cruz Biolabs, Heidelberg
Donkey anti goat IgG FITC	Santa Cruz Biolabs, Heidelberg
Donkey anti goat IgG Texas Red	Santa Cruz Biolabs, Heidelberg
Goat anti mouse IgG HRP	Upstate Biotechnology, Hamburg
Mouse anti rabbit IgG HRP	Chemicon, Southampton
Streptavidin HRP	Dako, Hamburg

## 2.4 Primer

Die Primer wurden über die Firma EUROGENTEC bestellt und synthetisiert.

**Tabelle 1: Primertabelle**

Name	Nukleotidsequenz 5'.....3'	Referenzen
Naka sense	GCTGATCATGGTGGCTTTCAAAGGC	Glia 25 [Nakahama 1998]
Naka antisense	GCTCTAGATACAGAAGATAATACCTC	Glia 25 [Nakahama 1998]
Sobue sense	TTGGACCAATCATAGGCGC	BBA 1489 [Sobue 1999]

Sobue antisense	GGTCAATGTCGATCACATGC	BBA 1489 [Sobue 1999]
hβ-Aktin sense	AGAGATGGCCACGGCTGCTT	Cell 12 [Gandt 1980]
hβ-Aktin antisense	ATTTGCGGTGGACGATGGAG	Cell 12 [Gandt 1980]
hMIWC sense	GAAGATCTATGGTGGCTTTCAAAGGGGT	JBC 270 [Yang 1995]
hMIWC antisense	CCATGGTGACTCCCAGGCCTCCCA	JBC 270 [Yang 1995]
hMIWC sense	GGAATCCTCTATCTGGTCACA	JBC 270 [Yang 1995]
hMIWC antisense	TGTTTGCTGGGCAGCTTTGCT	JBC 270 [Yang 1995]
hA1/A2 sense	CCCCTAACACTCCAAAACCCAAT	Genomics 50 [Umenishi 1998]
hA1/A2 antisense	TCATGCCTTCCCCAGCCAGA	Genomics 50 [Umenishi 1998]
hA1/B1 sense	TTTCCTTTCTAGGGACAGTTTGGA	Genomics 50 [Umenishi 1998]
hA1/B1 antisense	GATGTTCTCTCTGGTACACAAAGG	Genomics 50 [Umenishi 1998]
hA1/C1 sense	CCCCTAACACTCCAAAACCCAAT	Genomics 50 [Umenishi 1998]
hA1/C1 antisense	GATGTTCTCTCTGGTACACAAAGG	Genomics 50 [Umenishi 1998]
rGAPDH sense	TGAAGGTCGGAGTGAACGGA	Glia 25 [Nakahama 1998]
rGAPDH antisense	GATGACCTTGCCAGGGGGG	Glia 25 [Nakahama 1998]

## 2.5 Molekulargewichtsstandards

### Proteingele

Color-3-Marker Wide Range

LMW Calibrations Kit für SDS

SDS-PAGE Standard Marker Low Range

SDS-Page Standard Marker Broad Range

Sigma, Deisenhofen

Amersham Pharmacia, Freiburg

Bio-Rad, München

Bio-Rad, München

### Nukleinsäuregele

DNA XVII 500bp Ladder	Roche Diagnostics, Mannheim
DNA Molecular Weight V Dig labelled	Roche Diagnostics, Mannheim
DNA Molecular Weight VIII 19-1114bp	Roche Diagnostics, Mannheim
Mass Ruller DNA-Ladder High Range	Fermentas, St. Leon-Rot
Mass Ruller DNA-Ladder Low Range	Fermentas, St. Leon-Rot
RNA-Marker G319A	Promega, Heidelberg
RNA-Ladder low range SMO 0419	Fermentas, St. Leon-Rot
RNA Molecular Weight Marker I 0,3-6,9kb	Roche Diagnostics, Mannheim
Track-IT 10bp DNA-Ladder	Invitrogen, Eggenstein

### 2.6 Plasmide

pcR <sup>®</sup> 2.1 Vektor	Invitrogen, Eggerstein
pcR <sup>®</sup> TOPO 2.1 Vektor	Invitrogen, Eggerstein

### 2.7 Restriktionsenzyme

Eco RI	Roche Diagnostics, Mannheim
Eco RV	Roche Diagnostics, Mannheim

### 2.8 Antibiotika

Ampicillin Na-Salz cristal.	Biomol, Hamburg
Ampicillin anhydrous	Sigma, Deisenhofen
Gentamicin	Gibco, Eggerstein
Kanamizin-Solution	Sigma, Deisenhofen
Streptavidin	Dako, Hamburg

### 2.9 Weitere Reagenzien

Aprotinin; DNase; Hyaluronidase; Leupeptin; 1,2 Deoxyglukose; 3,3-Diaminobenzidin; 5-Hydroxydecanoat;  $\beta$ -Mercaptoethanol; Acrylamid 30 % Creatin Diaminobenzidin Diazoxid; Guanidin; Thiocyanat; Natriumcyan; Taurin; Pepstatin A, Twen 20; Tween 100;

Phorbolster PMA; Natriumorthovanadat; Paraformaldehyd; Protein Kinase C Inhibitor (Sigma, Deisenhofen). Ethidiumbromid, Laminin, Protease Inhibitor Complete, T<sub>4</sub> DNA-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim). Trypsin, Trypsininhibitor, Kollagenase aus *Cl. histolyticum*, Proteinkinase K (Serva, Heidelberg).

Alle weiteren nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Promega, Heidelberg; Biomol, Hamburg; Dade Behring, Marburg; Dako, Hamburg; Gibco, Eggenstein; Fluka, Deisenhofen und Perkin Elmer, Rodgau bezogen und hatten den Reinheitsgrad p.A. Zur Herstellung von Puffern und um Festsubstanzen in Lösung zu bringen, wurde überwiegend bidestilliertes Wasser verwendet. Bei Verwendung anderer Lösungsmittel werden diese im folgenden Methodenteil besonders vermerkt.

## 2.10 Lösungen und Puffer

### 2.10.1 Medien

#### Sterile Myozyten Medien:

Anwachsmedium: Medium 199 Mod. Earle`s Salts

Kulturmedium: 0,5 mM L-Glutamin, 10 µg/ml Gentamicin, 5 mM Creatin, 5 mM Taurin, 5 µg/ml Insulin, 10 mM HEPES, in Medium 199 Mod. Earle`s Salts pH:7,4

#### Sterile E.coli- Medien:

LB-Medium: 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 1 l.

LB<sub>amp</sub>-Medium: steriles Ampicillin (100 µg/ml) zu autokl. LB-Medium.

LB-Agar: LB Medium mit 15 g/l Agar autoklavieren.

SOC- Medium: 5 g NaCl, 2 g KCl, 5 g Hefeextrakt, 20 g Trypton/Pepton aus Casein, 10 mM Glukose, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 1 l, pH 7,5, autoklavieren

**2.10.2 Gele**

**Tab. 2: Gelzusammensetzungen**

<b>Gel</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Agarosegel (1 – 4 %)	1-4 % (w/v) Agarose in TBE-Puffer plus EtBr
Formaldehyd-RNS-Gel	1-2 % (w/v) Agarose 10 % (w/v) 5 x MOPS-Puffer 73 % (w/v) DEPC-Wasser 17 % (w/v) Formaldehyd
SDS-Sammelgel	1,3 ml H <sub>2</sub> O 250 µl 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 20 µl 10 % (w/v) SDS 333 µl Acrylamid/Bis (30 % Stock) 10 µl 10 % APS 2 µl TEMED
SDS-Trenngel 7,5 %	1,781 ml H <sub>2</sub> O 1,875 ml 1,5M Tris-HCl, pH 8,8 50 µl 10 % (w/v) SDS 1,250 ml Acrylamid/Bis (30 % Stock) 40 µl 10 % APS 4 µl TEMED
SDS-Trenngel 12 %	0,948 ml H <sub>2</sub> O 1,875 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 50 µl 10 % (w/v) SDS 2,083 ml Acrylamid/Bis (30 % Stock) 40 µl 10 % APS 4 µl TEMED

### 2.10.3 Puffer

- 5-Hydroxydecanoid Inhibierungspuffer: 32  $\mu$ M 5-HD, 119 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1,2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 10 mM Glukose, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ .
- Agarosegel-Denaturierungspuffer: 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl.
- Agarosegel-Neutralisationspuffer: 5 M Tris/HCl, pH 7,4; 3 M NaCl.
- Anodenpuffer Blotting I: 0,3 M Tris, 20 % (w/v) Methanol mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 l.
- Anodenpuffer Blotting II: 25 mM Tris 20 % (w/v) Methanol mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 l.
- Blocklösung (Immunfärbung): 0,5 % Triton / PBS.
- Blockpuffer (Western-Blot): 5 % Magermilchpulver in PBS-0,05% Tween 7,4.
- Coomassie-Entfärbelösung: 100 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 75 ml Methanol, 825 ml  $\text{H}_2\text{O}$ .
- Coomassie-Färbelösung: 0,5 g Coomassie Blue R 250, 25 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 125 ml Methanol.
- Coomassie-Fixierlösung: 100 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 500 ml Methanol, 400 ml  $\text{H}_2\text{O}$ .
- Diazoxid Kanal-Trigger-Lösung: 18  $\mu$ M Diazoxid in DMSO, 119 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1,2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 10 mM Glukose, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,4.
- Denaturierungslösung für RNS: 35  $\mu$ l Formaldehyd, 100  $\mu$ l Formamid, 40  $\mu$ l 5x MOPS-Puffer, 2  $\mu$ l EtBr (10 mg/ml).
- DNS 10 x Ladungspuffer: 0,21 % (w/v) Bromphenolblau, 0,21 % (w/v) Xylene-Cyanol, 0,2 M EDTA pH 8, 50 % Glycerin.
- EM Puffer 50 mM: 38,8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 61,2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH: 7,2.
- Ethidiumbromid-Färbelösung: 1  $\mu$ g/ml EtBr in TBS-Puffer.
- Fixierlösung (Immunfärbungen): 4 % Paraformaldehyd in 1 x PBS.
- Fixierlösung (isolierte Kardiomyozyten): 4 % Paraformaldehyd, 0,5 % Glutaraldehyd in 0,2 M Krebs-HEPES-Puffer, pH 7,4.
- Hauptperfusat (Kollagenasepuffer): 119 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1,2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 10 mM Glukose, 0,15% (w/v) Hyaluronidase, 0,1 % (w/v) Kollagenase, pH 7,4.
- Hämalaun-Färbelösung: 0,1 % (w/v) Hämatoxylin, 0,2 % (w/v) Natriumjodat, 2 % (w/v) Kalialaun.
- Hypotonischer-Puffer: 10 mM Tris/HCl, 0,1 mM PMSF, 2,6 mM DTT, pH 7,4.

- Isotonischer-Puffer: 250 mM Saccharose, 10 mM Tris/HCl, 0,1 mM PMSF, 2,6 mM DTT pH 7,4.
- Kathodenpuffer: 40 mM 6-Aminohexansäure, 0,01 % SDS, 20 % (v/v) Methanol.
- Krebs-Hepes-Puffer: 140 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 200 mM Hepes, 6,5 mM Glukose, 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4.
- Ladungspuffer 5 x f. RNS: 50 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau, 1 mM EDTA (pH8) in DEPC-Wasser.
- Ladungspuffer (Lämmli) f. Proteine: 1,75 ml 0,5M Tris-HCl, pH 6,8, 1,5 ml Glycerin, 5 ml 10 % (w/v) SDS, 0,5ml MecEtOH, 1,25 g Bromphenolblau.
- Lyse-Puffer (Gewebe): 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton 100, 0,5 % Natriumdeoxycholat, 1 mM EDTA, 1mM Natriumvanadat, 10 mM NaF, 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Leupeptin, Pepstatin, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Aprotinin, 1 mM PMSF, pH 7,4.
- Minipräp-Lösung-1: 50 mM Tris-Base, 10 mM EDTA, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNase, pH 5,5 mit HCl.
- Minipräp-Lösung-2: 200 mM NaOH, 1 % SDS.
- Minipräp-Lösung-3: 3 M K-Acetat, pH 5,5.
- Lösung-D für RNS-Präp.: 250 g Guanidintiocyanat, 293 ml DEPC-Wasser, 17,6 ml 750 mM Na-citrat, 26,4 ml 10 % Sarcosyl, 3,6  $\mu\text{M}$   $\beta$ -Mercaptoethanol.
- MOPS-Puffer 5 x: 0,1 M MOPS, 40 mM Na-acetat, 5 mM EDTA, in DEPC-Wasser.
- PBS: 140mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4.
- Pharmakologischer-Inhibierungspuffer: 20 mM NaCN, 119 mM NaCl, 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1,2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 20 mM 1,2 Deoxyglukose, pH 7,4.
- Phorbolsterpuffer zur PKC-Aktivierung: 500 nM PMA in 0,1 % DMSO, 119 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1,2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 10 mM Glukose, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,4.
- Ponceau-S-Färbelösung: 0,1 % Ponceau-S, 5 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$  in  $\text{H}_2\text{O}$
- Prähybridisierungs-Blockreagenz: 2 x SSC, 0,1 % SDS oder 0,5 % SSC, 0,1 % SDS, pH 7,2.
- Prähybridisierungspuffer: 50 mM Na-Phosphat pH 7, 50 % Formamid, 2 % Blockreagenz, 7 % SDS, 5 % SSC, 0,1 % Lauroylsarcosin, alles in DEPC.

- Proteinkinase-C-Inhibitor-Lösung: 10 nM PKCI, 119 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1,2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 10 mM Glukose, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ .
- RF1-Puffer: 100 mM RbCl, 30 mM K-Acetat, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 50 mM  $\text{MnCl}_2$ , 15 % (w/v) Glycerin, pH 5,8 mit 0,2 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$ .
- RF2-Puffer: 10 mM RbCl, 10 mM MOPS, 75 mM  $\text{CaCl}_2$ , 15 % (w/v) Glycerin, pH 6,8 mit 0,2 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$ .
- RIPA-Puffer: 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 % NP 40, 0,25 % Natrium-deoxy-cholat, 1 mM EDTA, 1 mM Natriumvanadat, 1 mM NaF, 2  $\mu\text{g/ml}$  Leupeptin, Pepstatin, 5  $\mu\text{g/ml}$  Aprotinin, oder Proteasenscocktail (Roche), 1 mM PMSF, 1 mM Na-Orthovanadat, pH 7,4.
- SSC-Puffer: 15 mM Natriumcitrat pH 7, 150 mM NaCl.
- Speicherpuffer: 25 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 mM EGTA, 120 mM K-Glutamat, 10 mM HEPES, 10 mM Glukose, pH 7,4.
- Stripping-Puffer: 2 % SDS, 62,5 mM Tris/Cl pH 6,8, 67,5 %  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,78 % 2-MecEtOH.
- TBE-Puffer 10 x: 89 mM Tris/Borat, 108 g Trisbase, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA.
- TE-Puffer mit unterschiedlichen pH: 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA.
- TE-Puffer f. RNS: 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, in DEPC-Wasser, pH 7,4.
- Tyrodepuffer: 119 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1,2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 10 mM Glukose, pH 7,4.
- Vorperfusat: 119 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1,2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 10 mM Glukose, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,4.

## 2.11 Zelluläre-Methoden

### 2.11.1 Silikonisieren von Glaswaren

Um das Anhaften von Zellen in Suspensionskulturen und Zellaufschlüssen zu verhindern, wurden alle verwendeten Glaswaren mit einem Silikonfilm überzogen. Das Silikonöl wurde in die zu beschichtenden Gefäße gegeben. Nach 30-s Schütteln waren diese vollständig benetzt. Nach Abgießen des Silikonöls wurde bis zu 6 x mit Aqua bidest. gespült und anschließend das Öl im Heißluftschrank bei 100 °C eingebrannt. Dann wurden die Gefäße für 2 h bei 180 °C sterilisiert.

Zum Entfernen des Silikons wurden die Glaswaren für 30 min in 0,5 M NaOH erhitzt und anschließend gründlich gespült.

### **2.11.2 Isolierung adulter ventrikulärer Kaninchen-Kardiomyozyten**

Es wurden männliche New Zealand White Kaninchen mit einem Gewicht von 2900 bis 3200 g und einem Alter von 6 - 8 Monaten verwendet. Die Experimente waren aufgrund der Organentnahmen nach §8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes, anzeigepflichtig und entsprachen in allen Teilen den gesetzlichen Bestimmungen über den experimentellen Umgang mit Säugetieren.

Zur Narkose erhielten die Tiere zunächst über die Ohrvene eine intravenöse Kombinationsanästhesie von 0,25 mg/kg Ketavet und Rompun. Danach wurden die Tiere tracheotomiert und über einen Kleintier-Respirator (Ugo-Basile 7025) mit O<sub>2</sub>-angereicherter Raumluft beatmet. Die Muskelrelaxation erfolgte mit Pancuroniumbromid (0,25 mg/kg). Nach medianer Sternotomie und Perikardiotomie wurden die Herzen durch ein kalziumhaltiges, Carbogen-begastetes Perfusionsmedium (Tyrode-Bikarbonat-Puffer) in einer modifizierten Langendorff-Anlage über 5 bis 10 min blutfrei gespült (Eckel and Reinauer, 1983). Danach wurden die Herzen 10 min lang mit einem Tyrode-Bicarbonat-Puffer ohne CaCl<sub>2</sub> von Kalzium freigespült. In einer dritten Perfusionsphase wurde die Lyse des Bindegewebes mit einem rezirkulierenden Kollagenase-Puffer eingeleitet. Der Durchfluss betrug etwa 10 ml/min. Der Perfusionsdruck von 80 mmHg wurde während des Bindegewebe-Verlustes mit einer zusätzlichen Pumpe (Föhr FKE 2001) aufrechterhalten. Diese Perfusion mit dem Hauptperfusat wurde nach 8 bis 15 min beendet.

### **2.11.3 Präparation und Aufschluss der Kardiomyozyten**

Das Herz wurde isoliert, die Ventrikel voneinander getrennt und mechanisch zerkleinert. Nach einer 5 bis 10-min Inkubation mit dem Hauptpuffer in einem offenen, silikonisierten Erlenmeyerkolben wurden die Kardiomyozyten in einem Carbogen-gesättigten Speicherpuffer (s. 2.10.3) bei 37 °C unter Rundschüttelung im Wasserbad (150 upm) weiter aufgearbeitet.

Bei der Passage der Zellsuspension durch ein Sieb (Porengröße 700 µm) wurden Bindegewebspartikel abgetrennt. Danach wurden die Zellen für 3 min bei 25 x g (300 upm) zentrifugiert und anschließend im Speicherpuffer resuspendiert. Um Zellaggregate zu vereinzeln, wurden die Kardiomyozyten für 7 min mit Trypsin (0,59 U/ml) inkubiert und die Proteolyse anschließend durch Zugabe eines Trypsininhibitors (2,4 U/ml) gestoppt.

Die Zellen wurden durch Gaze (Porengröße 300 µm) filtriert und erneut bei 25 x g (300 upm) zentrifugiert. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Sedimentationseigenschaften wurden schließlich die abgestorbenen Kardiomyozyten von den vitalen Muskelzellen durch 3 Waschschrirte mit Storagepuffer abgetrennt. Dabei sedimentierten die stäbchenförmigen, vitalen Kardiomyozyten schneller als die abgerundeten, toten Zellen, deren kontraktiler Apparat abgebaut oder zerstört war. Nach ca. 20 min wurden die finalen Konzentrationen von Magnesium und Kalzium auf 1 mM eingestellt.

#### **2.11.4 Qualitätskontrolle der Zellisolate**

Zellzahl und Vitalität (prozentualer Anteil der stäbchenförmigen Zellen an der Gesamtzellzahl) wurden mit einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer lichtmikroskopisch bestimmt. Die Gesamtzellzahl der voneinander getrennten ventrikulären Kardiomyozyten ergab sich aus dem Produkt der ausgezählten Zellen in einer 1:10 Verdünnung, Umrechnungsfaktor der Fuchs-Rosenthal Zählkammer (= 6250) und dem Suspensionsvolumen. Die Vitalitätsrate der Zellen ergab sich aus der Zahl lebender Zellen dividiert durch alle Zellen im Auszählquadranten (lebende plus tote) multipliziert mit 100.

Bis zur weiteren Verwendung wurden die Herzmuskelzellen für 1 h bei 37 °C im Rundschüttler inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Zellen des rechten und linken Ventrikels entsprechend weiterbehandelt. Sie wurden entweder

- in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert oder
- direkt aliquotiert und für die folgenden Untersuchungen mit unterschiedlichen Substanzen inkubiert oder
- für die Kultivierung als Primärzellen mit dem spezifischen Medium vorgewaschen.

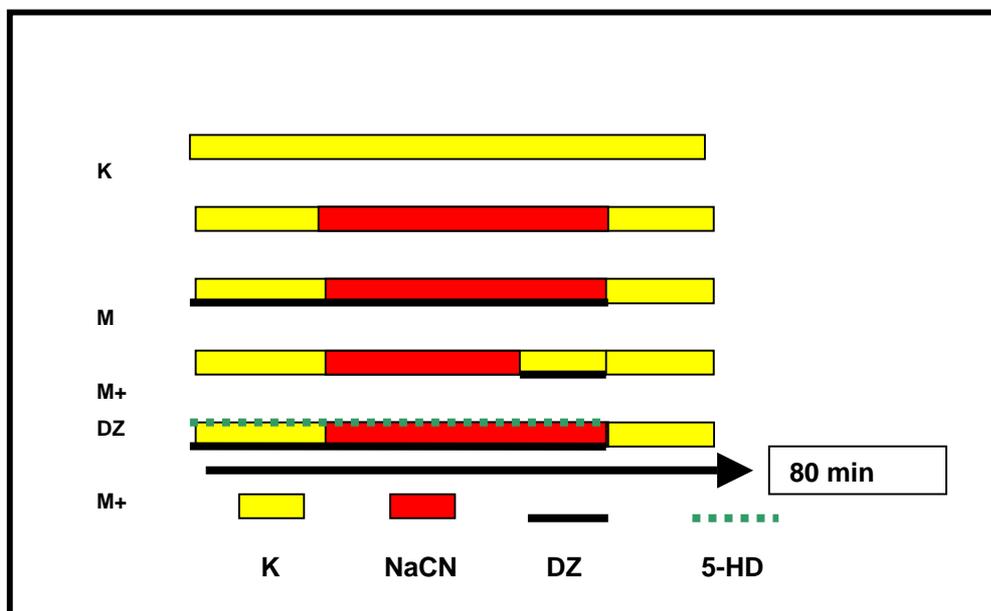
#### **2.11.5 Primärkulturen**

Zunächst wurden die Kulturschalen oder die Objektträger (OTs) mindestens 1 h vor der Aussaat mit Laminin (2 µg/cm<sup>2</sup>) vorbeschichtet. Tote Kardiomyozyten liessen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Sedimentationseigenschaften von den vitalen Zellen trennen (s. 2.11.3.). Der Überstand mit den toten Zellen wurde vorsichtig abgenommen. Nachfolgend wurden die Zellen 1 x mit Anwachsmedium (37 °C; Medium 199; s. 2.10.1) gewaschen und für 5 min bei RT und 25 x g pelletiert; der Überstand wurde verworfen. Die gereinigten Kardiomyozyten wurden gleichmäßig in Anwachsmedium resuspendiert und direkt auf die Laminin-vorbeschichteten Kulturschalen / OTs verteilt. Anschließend wurden die Zellen für 3 h im Anwachsmedium im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert.

Das Medium wurde abgesaugt, abgelöste Zellen verworfen und die vitalen Zellen für 16 h in Kulturmedium inkubiert. Nach erneutem Wechsel des Mediums wurden die Zellen für die anschließenden Messungen oder Induktionen für 3 h in Kulturmedium inkubiert.

### 2.11.6 Inkubation isolierter Kardiomyozyten

**Pharmakologische metabolische Induktion.** Es wurden stets frisch präparierte Kardiomyozyten verwendet, die im  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -haltigen Tyrode-Puffer in insgesamt fünf Zellaliquots (Abb. 2) vorinkubiert wurden. Ein erstes Aliquot mit Puffer fungierte als Kontrolle (**K**). Die Aufarbeitung und Inkubation der pharmakologisch induzierten Zellen fand im Kontrollpuffer statt.



**Abb. 2: Modifizierte Versuchsgruppen für den Zellaufschluss** (Murata et al., 2001)

**K:** Kontrolle; **M:** metabolische Inhibierung; **DZ:** Diazoxid; **5-HD:** 5-Hydroxydecanoat; **NaCN:** Natriumcyanid

Im 2. Aliquot wurde durch Inhibierung der Zellen eine pharmakologische Ischämie simuliert (**M**). Nach einer 20-min Vorinkubationszeit im Kontrollpuffer wurde den Zellen NaCN-1,2-Deoxyglukose (20 mM) statt Glukose über 50 min verabreicht. NaCN in Verbindung mit 1,2-Deoxyglukose ist ein Hemmstoff.

Zur Triggerung der mitochondrialen ATP-abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanäle wurde Diazoxid (18  $\mu\text{M}$ ) dem 3. Zellaliquot noch vor der Inhibierung mit NaCN verabreicht (**M+DZ**).

Einem weiteren Zellaliquot wurde Diazoxid (18  $\mu\text{M}$ ) erst nach einer 25-min Einwirkzeit der NaCN-1,2-Deoxyglukose (20 mM) verabreicht (**M+DZs**).

Das 5. Zellaliquot wurde unter den gleichen Bedingungen wie das dritte Zellaliquot mit dem Zusatz von 5-HD (36  $\mu\text{M}$ ; **MI+DZ+5HD**) inkubiert. 5-HD ist ein Antagonist des mitochondrialen ATP-abhängigen- $\text{K}^+$ -Kanalöffners Diazoxid.

Den Protokollschritten für die Aliquots 2 bis 5 folgte je eine Reoxygenierung über 10 min.

Die so gewonnenen Kardiomyozyten wurden subzellulär fraktioniert, für Proteinanalysen oder Nukleinsäureanalysen aufgeschlossen oder eingefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

**Mit aktivierter Proteinkinase C.** Auch in dieser Serie wurden stets frisch präparierte Kardiomyozyten verwendet, die im  $\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$ -haltigen Tyrode-Puffer in vier Zellaliquots (Abb. 3) vorinkubiert wurden.

Ein Aliquot fungierte im Tyrode-Puffer als Kontrolle (**K**). Die Aufarbeitung und Inkubation der Zellen mit den zugeführten Substanzen fand im Kontrollpuffer statt.

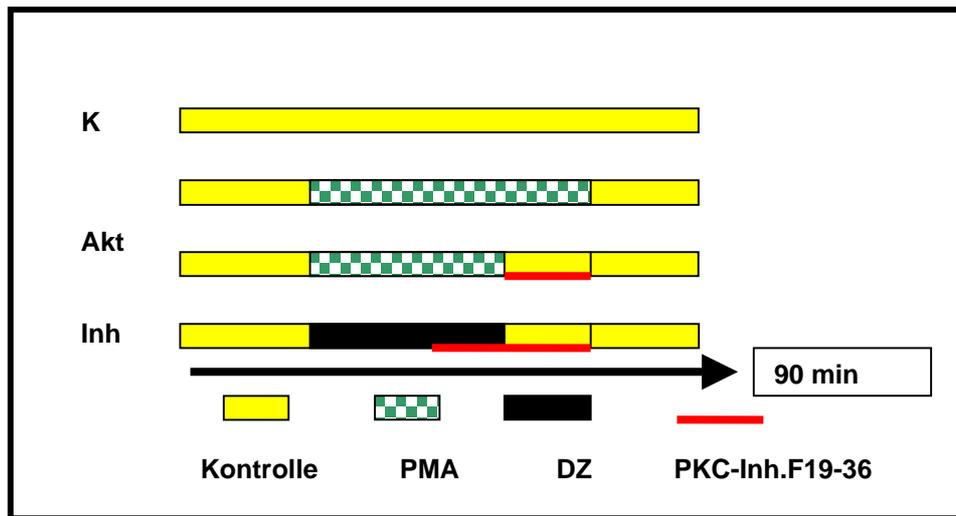
Im 2. Zellaliquot wurde den Zellen Phorbol-12-Mystrat-13-Acetat (PMA), ein starker NO-Promoter, zugesetzt. PMA ist in der Lage, die PKC zu aktivieren (Nakahama et al., 1999) (**Akt**). Dies geschah nach einer 20-min Vorinkubationszeit im Kontrollpuffer. Dann wurde den Zellen PMA (500 nM) über 50 min verabreicht. Es folgte eine 10-min Reperfusion.

Dem 3. Zellaliquot wurden 500 nM PMA mit einer verkürzten Einwirkzeit von 35 min zugegeben. Anschließend folgte 15 min lang die Zugabe des Protein-Kinase-Inhibitors F19-36 (10 mM). Es folgte eine 10-min Reperfusion (**Inh**).

Zur Triggerung der mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanäle wurde dem 4. Zellaliquot Diazoxid (18  $\mu\text{M}$ ) verabreicht. Anschließend wurde ebenfalls mit Hilfe des PKC-Inhibitors über 25 min inhibiert (**DZ-Inh**). Das Öffnen der ATP-sensitiven K-Kanäle in Kardiomyozyten wird als protektiv beschrieben (Liu et al., 1996; Walsh et al., 1994; Tomai et al., 1994).

Am Ende des Protokolles für die Aliquots 2 bis 5 wurden die Zellen 10 min lang reoxygeniert.

Die so gewonnenen Kardiomyozyten wurden entweder subzellulär fraktioniert, für Proteinanalysen oder Nukleinsäureanalysen aufgeschlossen oder eingefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.



**Abb. 3: Versuchsanordnung und Verlauf für den zellulären Proteinkinase-Aufschluss**

**K:** Kontrolle; **Akt:** Aktivierung der PKC; **Inh:** Inhibierung der PKC; **DZ:** Diazoxid;  
**PMA:** Phorbol-12-Mystrat-13-Acetat; **PKC-Inh.F19-36:** spezifischer PKC Inhibitor

### 2.11.7 Laminin Beschichtung

Zur Adhäsion der Kardiomyozyten wurde die Suspensionskultur auf steril mit Laminin (20 µg/µl) beschichteten OTs in Flexiperm-Kammern überführt. Dazu wurden die frisch isolierten Kardiomyozyten für die Kultivierungsversuche - wie in 2.11.5 beschrieben - behandelt und in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das überschüssige Laminin steril abgesaugt und die steril überführten Zellen mit dem AnwachsmEDIUM in die Gefäße oder Kammern überführt.

### 2.11.8 Pharmakologische Induktion der Primärkultur

Adhärente Kardiomyozyten wurden unter ischämischen Bedingungen (**MI**) (s. 2.11.6) mit Kardiomyozyten unter normoxischen Bedingungen (**K**) verglichen.

Die ischämischen Zellen wurden in drei Gruppen unterteilt.

MI Gruppe 1: Ischämiezeit von 1 h.

MI Gruppe 2: Ischämiezeit von 3 h und

MI Gruppe 3: mit Ischämie-induzierenden Substanzen, 16 h.

Es folgte bei allen drei Gruppen eine Reoxygenierung nach Ablauf der Versuchszeiten. Die Kardiomyozyten wurden subzellulär fraktioniert, für Proteinanalysen oder Nukleinsäureanalysen aufgeschlossen oder eingefroren und bei -80°C gelagert.

### **2.11.9 Passagieren der kardialen Primärkulturen**

Der Zellrasen wurde zweimal mit 1 x PBS pH 7,4 gewaschen. Über 3 min wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung (3 ml; 37 °C) vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst und auf beschichtete Kulturflaschen (75 cm<sup>3</sup>) mit je 5 ml Medium/Flasche ausgesät. Die Zellkulturen wurden anschließend bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und jeden zweiten Tag unter dem Mikroskop kontrolliert. Die verwendeten Zellen benötigen beim Umsetzen (Passagieren) bis zum Erreichen der Konfluenz auf dem Boden der Zellkulturflaschen 2 bis 3 Tage. Diese passagierten Zellen ließen sich bis zu 14 Tage kultivieren und für Direktversuche oder Langzeitversuche verwenden. Nach Beendigung der Versuche wurden die Zellen im flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

## **2.12 Biochemische Methoden**

### **2.12.1 Lyse des Herzgewebes**

Herzen von männlichen NZW Kaninchen wurden entnommen (s. 2.11.2) und in eine Petrischale mit eiskaltem, isotonen Aufschlusspuffer (pH 7,4) überführt. Mit diesem Puffer wurde das Herz blutfrei gespült. Nach Entfernung der Vorhöfe und anhängender Gefäße wurde das Ventrikelgewebe entweder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert oder direkt auf Eis inkubiert, aufgeschlossen und subzellulär fraktioniert.

### **2.12.2 Subzelluläre Fraktionierung des Ventrikelgewebes**

Die subzelluläre Fraktionierung erfolgte in Anlehnung an die Literatur (Uphues et al., 1994). Zunächst wurde das Ventrikelgewebe in hypotonem Aufschlusspuffer für 20 min aufgetaut und dann mit Hilfe eines Ultraturrax (IKA-Werke, Neu-Isenburg) 6 x 10 s mechanisch zerkleinert. Zwischen den einzelnen Ultraturrax-Behandlungen lagen Pausen von je 20 s, um das Gewebe nicht zu erwärmen. Die endgültige Homogenisation erfolgte in einem Glas-Teflon-Homogenisator (Braun, Melsungen). Der Aufschluss des Gewebehomogenats wurde im Mikroskop überprüft. Durch Zugabe einer 1,43 M Saccharoselösung wurde das Vollhomogenat isotoniert. Nach 10-min Zentrifugation bei 3000 x g wurde der Überstand abgenommen und in einer Ultrazentrifuge (Beckman) unter Verwendung eines Ti50-Festwinkelrotors bei 200.000 x g für 90 min zentrifugiert, um das Zytosol (Überstand) von der Rohmembran-Fraktion (Pellet) zu trennen. Die Rohmembran-Fraktion wurde in isotonem Aufschlusspuffer resuspendiert (Eppendorf-Homo-

genisator). Die Fraktionen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### **2.12.3 Präparation der Rohmembran-Fraktionen**

Die weitere Auftrennung der Rohmembran-Fraktion von solubilisierten Kardiomyozyten oder des Ventrikelhomogenats in Plasmamembran und mikrosomale Membran erfolgte durch einen diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten. Dafür wurde die resuspendierte Rohmembran-Fraktion auf den Gradienten, bestehend aus 0,572 M, 0,715 M; 1,0725 M und 1,43 M Saccharose-Lösungen, aufgeschichtet und 16 h bei 40.000 x g zentrifugiert (Beckman SW60-Ausschwingrotor). Als Plasmamembran-Fraktion wurde die 0,572 M und 0,715 M Saccharoseschicht und als mikrosomale Fraktion die 1,0725 M und 1,43 M Saccharoseschicht abpipettiert. Beide Fraktionen wurden in hypotonem Aufschlusspuffer isotonisiert, sedimentiert und in 200 – 500 µl isotonem Aufschlusspuffer resuspendiert. Schließlich wurden alle Fraktionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **2.12.4 Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmung der Plasmamembran-Fraktion und der mikrosomalen und der zytosolischen Fraktion wurde mit einem Bio-Rad-Proteintest (Bio-Rad, München) nach Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. Sowohl die Membranproben als auch die Standard-Konzentrations-Reihe (8fach) aus Rinderserumalbumin (1 µg/ml, reinst, Behring, Mannheim) zur Ermittlung einer Eichgeraden wurden für 1 h in 1 N NaOH bei 60 °C im Thermoblock inkubiert, mit 2 N HCl neutralisiert und mit 0,2 ml Bio-Rad-Reagenz versetzt und gemischt. Nach einer ca. 10-min Inkubationszeit wurde die Extinktion bei  $\lambda = 595$  nm gemessen und die Proteinkonzentration berechnet.

Handelte es sich um lösliche Proteine, so wurden die Proben und der Standard in Aqua bidest. aufgenommen. Mittels einer Verdünnungsreihe wurde die effizienteste Verdünnung zur Adsorptionsmessung ermittelt. Nach einer ca. 10-min Inkubationszeit mit dem Bio-Rad-Reagenz wurde die Extinktion bei  $\lambda = 595$  nm gemessen und die daraus resultierende Proteinkonzentration berechnet.

### **2.12.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen**

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte in SDS-Polyacrylamid-Gelen in der Gelapparatur Mini-Protean III Cell (Bio-Rad, München) nach Laemmli (Laemmli,

1970). Zur Auftrennung der Proteine wurden 0,75 mm dicke, diskontinuierliche, 5 %ige Sammel- und 7,5 - 12 %ige SDS-Polyacrylamid-Mini-Gele (Bio-Rad, München) gegossen. Die mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> in gleicher µg-Menge je Probe verdünnten Proben wurden mit 3 µl 3 x Laemmli-Puffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und 30 min bei 15 mA im Sammelgel und 16 h mit einer konstanten Stromstärke von 10 mA und bei 4 °C im Trenngel aufgetrennt. Zur Größenbestimmung wurden je nach zu erwartender Molekülgröße unterschiedliche Protein-Molekulargewichts-Standards mitgeführt, die unter den gleichen experimentellen Bedingungen verwendet wurden.

### 2.12.6 Transfer der Proteine (Western-Blotting)

Nach Auftrennung im SDS-Gel wurden die Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran transferiert. Die aufgetrennten Proteine wurden in einer Trans-Blot-SD-Apparatur mit Graphitelektroden (Bio-Rad, München) auf Hybond PVDF-Membranen (Immobilon P, Porengröße 0,45 µm; Amersham Pharmacia) transferiert. 6 Filterpapiere (Mukoll) wurden auf Gelgröße zurechtgeschnitten, in Anodenlösung I getränkt und auf die Anodenplatte der Blot-Apparatur gelegt. Drei weitere Filterpapiere wurden in Anodenlösung II getränkt und auf die ersten sechs geschichtet. Das Gel wurde für 5 min in Anodenlösung II äquilibriert, die Trägerglasplatte entfernt und auf das letzte Filterpapierpaket aufgelegt. Die in Anodenlösung II äquilibrierte markierte Blotmembran wurde ebenfalls auf das Gel gelegt. Neun weitere Filterpapiere wurden in Kathodenlösung getränkt und auf das Gel gelegt. Nach der Entfernung von Luftblasen wurde mit der Kathoden-Graphitplatte abgedeckt und der Transfer bei  $0,8 \text{ mA} \times \text{cm}^2 / \text{Blotfläche}$ , einer Spannung von 20 V und einer Leistung von 5 W für 1,5 h gestartet.

### 2.12.7 Färbetechniken

**Coomassie Blue-Färbung.** Die Färbung der Gele erfolgte in einer Färbewanne (RT bis 50 °C), in der das SDS-Gel, welches nicht für den Proteintransfer bestimmt war, im Coomassie angefärbt wurde. Die Inkubation erfolgte für 2 – 4 h in einem Schüttler und einer gefilterten Coomassie-Brillant Blue R250 Färbelösung. Anschließend wurde der unspezifische Hintergrund in 10 %iger Essigsäure für 2 h bei RT wieder entfärbt und das Gel schließlich für 30 min in einer 8,7 %igen Glycerinlösung präserviert.

**Ponceau S-Technik.** Die Membranabschnitte wurden mit den Markerproteinen für 10 min in Aqua bidest. gewaschen und anschließend für 10 bis 15 min in Ponceau S-Färbelösung inkubiert. Dann wurden die Membranen 1 x kurz und 1 x 10 min in Aqua

bidest. gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Membranabschnitte dienten bei der Auswertung der Membranen als Marker- und Positionsabgleich.

### **2.12.8 Immundetektion**

Die Blotmembranen wurden für 3 x 10 min in PBS-Puffer (pH = 7,4) gewaschen. Zur Ab-sättigung der unspezifischen Bindungsstellen an den Blotmembranen wurden die Blots über 1 h in Blockierlösung inkubiert und anschließend für 10 min mit PBST gewaschen. Es folgte eine Inkubation der Membranen mit den spezifischen Antikörpern in einer Anti-körperlösung (5 % (w/v) Magermilchpulver; 0,02 % (w/v) NaN<sub>3</sub>; in PBST) für 16 h bei 4 °C auf einem Rollenmischer. Daraufhin wurden die Membranen 2 x 2 min und 4 x 10 min mit PBST gewaschen. Im Anschluss erfolgte bei RT eine 2-h Inkubation mit den spezifischen HRP-Zweitantikörpern in einer entsprechenden Verdünnung der Antikörper-lösung (5 % (w/v) Magermilchpulver; 0,02 % (w/v) NaN<sub>3</sub>; in PBST).

Schließlich wurden die Blotmembranen 3 x 10 min mit PBST gewaschen, bis die Spuren des Zweitantikörpers an den nicht gebundenen Stellen entfernt waren.

Die Membranen wurden feucht bei -20 °C zur Archivierung eingefroren oder direkt mit einem Bio-Image-System visualisiert und mit der zugehörigen Analysesoftware (UVP Chromaphor) quantifiziert.

### **2.12.9 Detektion mit verstärkter Chemilumineszenz (ECL)**

Die Membranen wurden für die Quantifizierung der gebundenen Proteine mit einer spezi-fischen Chemilumineszenz-Lösung (Amersham, Freiburg) versetzt. Dazu wurden die Membranen für ca. 10 min dunkel in einer Mischung von ECL-Signal<sup>®</sup>-Peroxid-Substrat-lösung und ECL<sup>®</sup>-Luminol-Verstärkerlösung im Volumenverhältnis 1:40 (Amersham Pharmacia, Freiburg) inkubiert. Mit Hilfe eines UVP-LUMI-Imagers (Epichemi II Dark-room und der UVP-Chromaphor-Analyst-Software) wurden die Signale analysiert und quantifiziert.

### **2.12.10 Strippen von Membranen**

Analysierte Membranen wurden zur Wiederverwendung mit dem Strippingpuffer (s. 2.10.3) sowohl zur Abtrennung des primären Antikörpers als auch des Enzym-Konjugats behandelt. Die Antikörper-Stripp-Lösung wurde 1:1 mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> verdünnt und die Blotmembran für 30 min bei 50 °C in einem geschlossenen Gefäß in dieser Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Membranen für mindestens 2 x 5 min mit PBST

gewaschen. Zur erneuten Blockierung wurden die Membranen mit PBST und 5 % (w/v) Magermilchpulver für 1 h inkubiert. Die Membranen wurden zur Überprüfung noch vorhandener Konjugate mit dem ECL-Reagenz inkubiert. Die fertig gestriipten Membranen wurden für die Immunhistochemie erneut mit einem spezifischen Erst-Antikörper und im weiteren Verlauf abermals verwendet.

### **2.12.11 Präsentation der Daten und Statistik**

Unterschiede zwischen den Protokollen wurden mit Student's *t*-Test für gepaarte oder ungepaarte Daten geprüft. Die statistische Analyse wurde mit der Statistikanwendung des Computerprogramms „Sigma-Plot“ durchgeführt. Falls nicht anders angegeben, wurden die Daten jeweils als Mittelwerte  $\pm$  SEM (Standardabweichung der Mittelwerte) dargestellt. Unterschiede wurden als signifikant betrachtet, wenn  $p \leq 0,05$  war.

## **2.13 Molekularbiologische Methoden**

### **2.13.1 Direkte Probenentnahme und Transport**

Für die Präparation von RNS wurden ca. 100 mg Patienten-Gewebeproben (Universität Brüssel; Herzzentrum Bad Oeyenhausen) oder Kaninchen-Gewebeproben mit 400  $\mu$ l der Lösung-D (s. 2.10.3) und 3  $\mu$ l  $\beta$ -Mecaptoethanol versetzt. Die Proben in Lösung-D konnten mehrere Stunden bei RT transportiert werden, bevor sie ohne Lösung-D bei  $-80$  °C dauerhaft eingefroren wurden. Frisch isolierte kardiale Zellen wurden nach Sedimentation und Zentrifugation (300 upm) sofort bei  $-80$  °C eingefroren, sofern sie nicht für weitere Versuche genutzt wurden.

### **2.13.2 Isolierung von Ribo-Nukleinsäuren**

**Gesamt-RNS.** Die Isolierung von Gesamt-RNS erfolgte aus 100 mg Gewebe oder Zellpellet, auf  $N_2$  (flüssig) zermörsert. Die Isolierung wurde in 2 ml TRIzol<sup>®</sup>-Reagenz nach der Methode von Chomczynski (Chomczynski and Sacchi, 1987) durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen wurden mit DEPC (0,01 %) behandelt oder steril angesetzt. Glasgeräte und Spatel wurden nach Inkubation in DEPC-Lösung autoklaviert. Die Proben wurden mit Hilfe eines Ultraturrax (IKA-Werke, Neu-Isenburg), für 3 x 20 min auf Eis homogenisiert und nach Protokoll weiterverarbeitet. Das gewonnene RNS-Pellet wurde in 50 – 60  $\mu$ l Rnase-freiem Wasser resuspendiert, wobei in einigen Fällen zur Auflösung

des Pellets ein maximal 5-min Erwärmen auf 65 °C im Wasserbad notwendig war. Nach dem Aliquotieren wurde die RNS bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

**Gesamt-RNS mit Kit.** Die Isolierung von Gesamt-RNS aus Kaninchen-Ventrikeln erfolgte entsprechend dem Standard-Protokoll des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden). Das Gewebe wurde ebenfalls mit Hilfe eines Ultraturrax in 600 µl des entsprechenden Lyse-Puffers aufgeschlossen. Die RNS wurde in einem Volumen von 30 µl Puffer eluiert und bei -80°C gelagert.

### 2.13.3 Elektrophoretische Trennung von RNS

Die Gelelektrophorese-Trennung der RNS erfolgte in Horizontalgelkammern mit einem Gelvolumen von 100 ml und einem maximalen Probenvolumen von 30 µl. Vor dem Giessen der Gele wurden die Kammern für 60 min mit 3 %igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> befüllt und mit DEPC-H<sub>2</sub>O gespült. Für ein 1 %iges Gel wurden 1 g Agarose mit 73 ml DEPC-H<sub>2</sub>O und 10 ml 5 x MOPS-Puffer (s. 2.10.3) kurz aufgekocht (Lehrach et al., 1977). Nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C wurden 17 ml Formaldehyd hinzugegeben und das Gel gegossen. Den RNS-Proben wurden je 8 µl RNS-Denaturierungslösung (s. 2.10.3) auf ca. 4 - 5 µg RNS zugegeben. Die Proben wurden durchmischt, 5 min bei 65 °C denaturiert und bis zum Beladen der Gele auf Eis gelagert. Der Gellauf erfolgte für 1,5 h bei 40 mA. Als Laufpuffer wurde 1 x MOPS verwendet. Mit Hilfe eines UVP-LUMI-Imagers (Epichemi II Darkroom, Duisburg) und der UVP-Chromaphor-Analyst-Software wurde der Gellauf der Proben durch Signalgebung analysiert und quantifiziert.

### 2.13.4 Elektrophoretische Trennung von DNS

Die Gelelektrophoresen von DNS wurden in Horizontalgelkammern mit einem Gelvolumen von 100 ml durchgeführt (Sambrook et al., 1989). Dazu wurden 1 - 4 % Agarose mit 1 x Tris-Bohrat-gepufferter Kochsalzlösung (TBS-Puffer) kurz aufgekocht, nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C mit 5 µl einer 1 %igen Ethidiumbromid versetzt und das Gel gegossen. Nach dem Abkühlen wurde eine Volumeneinheit DNS mit 0,1 Volumeneinheiten 5 x Ladepuffer versetzt und die DNS für 1,5 h bei 50 V Spannung aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1 x TBS-Puffer verwendet. Zur Größenbestimmung wurden je nach zu erwartenden Fragmentgröße der Proben unterschiedliche DNS-Molekulargewichts-Standards unter den gleichen experimentellen Bedingungen mitgeführt.

Mit Hilfe unseres UVP-LUMI-Imagers (Epichemi II Darkroom, Duisburg) und der UVP-Chromaphor-Analyst-Software wurde der Gellauf durch Signalgebung der Proben analysiert und quantifiziert.

### 2.13.5 Nukleinsäuren-Konzentrationsbestimmung

Um Qualität und Quantität der DNS-, RNS- und Oligo-Proben zu bestimmen, wurde die optische Dichte (OD) entsprechend verdünnter Proben bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Der Quotient aus der OD (optical density) bei 260 nm und bei 280 nm ist ein Maß für den Reinheitsgrad der Nukleinsäuren. Bei erfolgreicher Isolation der Nukleinsäuren muss der Reinheitsgrad zwischen 1,6 und 2,0 liegen.

Die Konzentration wurde nach dem Lambert-Beerschen-Gesetze berechnet.

DNS  $50 \text{ g / l}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;

RNS  $40 \text{ g / l}^{-1}\text{cm}^{-1}$  und

Oligos  $33 \text{ g / l}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Die Konzentrationen wurden aus der Absorption mit Hilfe folgender Formel ermittelt:

$$\frac{\text{OD 260} \times \text{Verdünnung} \times \text{Extinktionsfaktor}}{1000} = \dots\dots\mu\text{g / } \mu\text{l Nukleinsäure}$$

### 2.13.6 copy DNS-Synthese

Nach Rupp (Rupp and Weintraub, 1991) erfolgte unter Anleitung des Kit-Herstellers (Roche, Mannheim) die Umwandlung der RNS in cDNS.

Die RNS-Proben wurden aufgereinigt. Alle Gefäße wurden in DEPC-Wasser vorbehandelt und autoklaviert. Die Konzentration der Proben wurde im Photometer bestimmt. Je nach Versuchsreihe wurden 0,5 - 3  $\mu\text{g}$  RNS-Probe eingesetzt. Die Konzentrationen richteten sich nach der Kit-spezifischen Anleitung. Diese Methode eignete sich auch zur Quantifizierung von mRNA-Expressionen (Koehler et al., 1995).

Die PCR-Amplifikation wurde mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

- |              |        |       |                            |
|--------------|--------|-------|----------------------------|
| - Schritt 1: | 10 min | 25 °C | Vordenaturierung           |
| - Schritt 2: | 45 min | 42 °C | Annealing (Hybridisierung) |
| - Schritt 3: | 5 min  | 95 °C | Elongation                 |
| - Schritt 4: | Pause  | 4 °C  | Abbruch                    |

### 2.13.7 PCR Bedingungen

Mit der von Mullis (Mullis et al., 1986) entwickelten Methode der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) wurden bestimmte Abschnitte der DNS exponentiell amplifiziert. Die eingesetzten Oligonukleotidpaare (Primer) dienen in dieser Reaktion als Startermoleküle. Die maximal zu wählenden Annealingtemperaturen ( $T_M$ ) für Primer berechnen sich nach folgender Formel:

$$T_M = 4 \text{ °C} \times (C+G) + 2 \text{ °C} \times (A+T)$$

$T_M$  setzt sich aus der Summe der Anzahl der einzelnen Basen im Primer zusammen, die dann mit einem spezifischen Faktor multipliziert werden. Oberhalb dieser Temperaturen "schmelzen" die Primer. Eine Bindung an das Template (DNS oder RNS) ist dann nicht mehr gewährleistet. Die optimale Annealingtemperatur wurde für jede Zielsequenz empirisch ermittelt.

### 2.13.8 Primer-gerichtete Fragmentierung der cDNS

Zur Herstellung von cDNS-Fragmenten für Klonierungen wurden die Taq- und die Pfu-Polymerase verwendet. Der Start der Reaktionen wurde mit 5 µl RT-Produkt (DNS-Template) durchgeführt. Zu dem Template wurden das sequenzspezifische Primer-Paar sowie weitere Reagenzien nach Hersteller-Angaben (Qiagen, Hilden) hinzugegeben.

Für die Taq-Polymerase galt das gleiche Protokoll wie für die Pfu-Polymerase. Lediglich die Elongationszeit wurde von 30 oder 90 s auf 2 min erhöht.

Die verwendeten Primer wurden anhand publizierter Sequenzen (PubMed) ausgewählt. Für die Detektion der PCR-Fragmente wurden verschiedene Primer-Paare gewählt, die innerhalb der amplifizierten Sequenz liegen (Tab. 1). Zur Analyse der PCR-Produkte wurde die gleiche Menge x µg Template mit 3 µl Ladungspuffer und  $H_2O_{bidest}$  versetzt und im 2 %igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Bestimmung der Fragmentlänge wurden Molekulargewichtsstandards (s. 2.5) verwendet. Die PCR-Amplifikation wurde mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

- Schritt 1:	300 s	95 °C	Vordenaturierung
- Schritt 2:	30-60 s	95 °C	Denaturierung
- Schritt 3:	30-60 s	$T_M$ °C	Primer-Annealing (Hybridisierung)
- Schritt 4:	30-60 s	72 °C	Elongation
- Schritt 5:	600 s	72 °C	abschließende DNS-Synthese
- Schritt 6:	Pause	4 °C	Pause

Die Hybridisierungstemperatur in Schritt 3 ist abhängig von den eingesetzten Primern; sie wurde für jedes Primerpaar bestimmt. Die Wiederholung der Schritte 2 - 4 (Zykluszahl) war ihrerseits von der Menge des eingesetzten Templates abhängig und wurde für Quantifizierungsexperimente ebenfalls für jedes spezifische DNS-Produkt optimiert, um die Plateauphase der PCR-Amplifizierung nicht zu erreichen (Koehler et al., 1995).

### 2.13.9 Ligation

Zur Ligation der cDNS-Fragmente in die Vektoren pcR<sup>®</sup> 2.1 Plasmid und pcR<sup>®</sup> TOPO 2.1 Plasmid (Invitrogen, Eggerstein) wurden die frisch fragmentierten cDNS-Proben und der linearisierte Vektor (50 ng) im Verhältnis 3 Teile cDNS zu 1 Teil Vektor in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 1 µl T4-Ligase (1 U/µl) und dem 10fach Puffer für mindestens 16 h bei 4 °C inkubiert. Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden in einem Reaktionsgefäß vermischt und kurz auf 45 °C erwärmt, um nichtkovalente Bindungen zu trennen. Neben dem regulären Ligationsansatz wurden zur Kontrolle eine Scheinligation ohne Ligase und eine Autoligation eines linearisierten Plasmids (pUc 19) durchgeführt. Die Ansätze wurden gemischt und 3 h bei RT und/oder 16 h bei 4 °C inkubiert. Es wurden hochkompetente *E. coli* INV- $\alpha$ F<sup>-</sup> und TOP 10 F<sup>-</sup>-Zellen und SOC-Medium hergestellt (Sambrook et al., 1989) und zur Ligation verwendet. Die Ligation wurde nach Herstellerangaben (Invitrogen, Eggerstein) durchgeführt.

### 2.13.10 Herstellung kompetenter Bakterien

Klonal effiziente - sogenannte kompetente - *E.coli* Bakterien wurden in Übereinstimmung mit der Literatur (Hanahan, 1983) hergestellt. Vorkulturen der Bakterien-Zellen wuchsen bei 37 °C im Wärmeschrank für 16 h. Jeweils 50 ml SOC- oder LB-Antibiotika-Medium wurden mit einer frischen LB-Platten-ÜN-Kultur angeimpft. Je nach Zelltyp erfolgte eine 2 - 5-h Inkubation im Kreisrüttler (125 upm) bei 37 °C. Die Inkubation der Bakterienzellen wurde bis zu einer OD von 660 belassen, bevor die Bakterien in ihre

Log-Wachstums-Phase übergehen. Jeweils 25 ml Kultur wurden in ein geeignetes steriles Zentrifugenröhrchen gefüllt und 15 min auf Eis inkubiert. Dann folgte ein 25-min Zentrifugieren (4000 upm) bei 4 °C. Der Überstand wurde dekantiert. Je Zentrifugenröhrchen wurden 8,3 ml vorgekühlter (0 °C) RF1-Puffer hinzugegeben und das Zellpellet mit der 1 ml Eppendorfpipette resuspendiert. Es folgten eine 15-min Inkubation auf Eis und erneutes 25-min Zentrifugieren. Der Überstand wurde abgegossen. Je Zentrifugenröhrchen wurden 2 ml vorgekühlter (0 °C) RF2-Puffer hinzugegeben und das Zellpellet resuspendiert. Schließlich wurde 15 min lang auf Eis inkubiert. Je 200 µl des Ansatzes wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der kompetenten Zellen bei –80 °C.

#### **2.13.11 Transformation von E. coli**

Die Transformation der Expressionsplasmide in kompetente Bakterien erfolgte in Eppendorf-Reaktionsgefäßen nach der Hitze-Schock-Methode. Hierzu wurden 50 µl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 3 - 5 µl des Ligationsansatzes für 30 min kühl inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen im 42 °C warmen Wasserbad für 90 s einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach einer 2-min Inkubation auf Eis wurden die Transformationsansätze mit je 250 µl sterilem SOC-Medium für 1 h im horizontalen Bakterien-schüttler bei 37 °C und 225 upm inkubiert.

Die Agarplatten wurden mit 40 µl einer 100 mM IPTG-Stocklösung und 40 µl einer 40 mg/ml X-Gal-Stocklösung für 1 h vorinkubiert. Aliquots der Transformationsansätze (50 µl und 200 µl) wurden auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert. Nach 16 h Inkubation auf den Antibiotika-haltigen Agarplatten bei 37 °C wurde gezielt selektioniert und die Effizienz der Transformation (cfu/µg) mit dem Kontrollplasmid pUC 18 verglichen (Sambrook et al., 1989). Positive Klone wurden unter sterilen Bedingungen in 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin ÜN bei 37 °C im Wärmeschrank zur Proliferation inkubiert.

#### **2.13.12 Präparation im Kleinmaßstab (Minipräp)**

Jeweils 1 ml der Bakterien/Antibiotikum-Kultur (s. 2.13.11) wurden in sterile 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und für 5 min bei 14000 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet leicht angetrocknet und dann das Reaktionsgefäß wieder auf Eis gestellt. Das Pellet wurde mit 200 µl Lösung I (isoton. Lsg. mit RNase) versetzt und gevortext. Es folgten Zugabe von 200 µl Lösung II (Zelllyse alkalisch), mischen und auf Eis inkubieren (5 min). Durch organische Lösungsmittel und Detergenzien sowie

Alkali- und Hitze-Einwirkung wurde eine Bakterienlyse induziert (Birnboim and Doly, 1979). Dabei wurde die chromosomale DNS denaturiert und die Plasmid DNS topologisch verflochten.

Dann folgte erneut Zugabe von 200 µl Lösung III (Neutralisation), mischen und auf Eis inkubieren (10 min). Das anschließende Zentrifugieren (14000 upm) bei RT dauerte 10 min. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und 420 µl (= 0,7 v/v) Isopropanol abs. (RT) zugegeben. Nach dem Vortexen folgte eine 10-min Inkubation bei RT und 10-min zentrifugieren (14000 upm) ebenfalls bei RT. Der Überstand wurde dekantiert. Anschließend erfolgte eine Purifikation der DNS mittels EtOH. Das Pellet wurde mit 1 ml 70 % EtOH gevortext und für 5 min bei RT ruhen gelassen und wie vorher zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet getrocknet, bevor es in TE-Puffer (pH 8 mit 20 µg/ml RNase A) aufgenommen wurde. Die Proben wurden für die Restriktion weiter verwendet oder direkt bei -20 °C gelagert. Es wurden ausschließlich selbst hergestellte Lösungen verwendet (s. 2.10.1).

#### **2.13.13 Restriktionsverdau**

Es wurde in Übereinstimmung mit der Literatur (Sambrook et al., 1989) und den Herstellerangaben vorgegangen. Restringiert wurde in 10 µl-Ansätzen mit etwa 1 U Restriktionsenzym pro µg DNA. Die Dauer der Restriktionen variierte zwischen 1 - 2 h oder 16 h bei 37 °C. Bei Bedarf wurden die Restriktionsenzyme anschließend durch Erhitzen auf 65 °C für 10 min inaktiviert. Je nach weiterer Verwendung der restringierten DNS wurde das Enzym durch Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt. Die Bestimmung und Auftrennung der DNS erfolgte mit Markern über Agarosegele.

#### **2.13.14 Glyzerinkultur**

Es wurden 800 µl einer positiven 16-h Kultur mit 300 µl sterilem Glycerin gemischt. Nach dem Vortexen wurde der Ansatz für mindestens 1 h auf Eis inkubiert. Dann folgten das Einfrieren in flüssigem Stickstoff und die dauerhafte Lagerung bei -80 °C.

#### **2.13.15 DNS-Sequenzierung**

Die DNS-Sequenzierung wurde nach einer Variante der Didesoxymethode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Dafür wurde eine modifizierte T7-DNS-Polymerase (13 U/µl; Sequenase 2.0™, Fa. USB/Amersham, Braunschweig) verwendet. Für GC-reiche Sequenzen wurde der Deaza G/A T7 Sequencing™ Kit (Fa. Pharmacia, Freiburg) mit

7-deaza dGTP und 7-deaza dATP anstelle von dGTP und dATP verwendet. Die DNS-Sequenzierung wurde, mit einigen Variationen, nach Herstellerangaben durchgeführt. Alle Arbeiten des Sequenzierungs-Ansatzes und der Sequenzierungs-Ausführung wurden vom Biologisch Medizinischen Forschungs-Zentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Die Auftrennung und Auswertung der Banden erfolgte über einen vollautomatischen ABI Prism DNS-Sequencer. Die Auswertung der Sequenzanalysen erfolgte mit der Standardsoftware CHROMAS PRO Version 1.22 (Chromas, Braunschweig).

#### **2.13.16 In vitro Transkription und Sonde für Northern Blot**

Der Plasmid-DNS-Vektor wurde mit entsprechenden Restriktionsenzymen linearisiert. Dazu wurden 30 - 40 µg Plasmid-DNS mit Einheiten des Restriktionsenzym EcoR1 ÜN bei 25 °C inkubiert. Die Vollständigkeit der enzymatischen Verdauung wurde gelelektrophoretisch überprüft. Mit dem linearisierten Plasmid lässt sich bei in *vitro* Transkription mit einer Sonde eine Plusstrang-DNS generieren. Zum Nachweis dieser RNS mittels Hybridisierung wurde in *vitro* eine Transkription mit T7-RNS-Polymerase des mit dem Restriktionsenzym linearisierten Plasmides hergestellt.

#### **2.13.17 Northern-Blot-Analyse**

Nach Auftrennung aufgereinigter RNS-Präparationen (s. 2.13.3) in Agarosegelen unter denaturierenden Bedingungen wurde die RNS in gleicher Menge (1 – 5 µg Gesamt-RNA oder 5 µg Poly(A)-mRNS pro Gelspur) durch Kapillartransfer auf Nylonmembranen übertragen (Sambrook et al., 1989). Dazu wurden die RNS-Gele (ohne EtBr) nach der Elektrophorese zur Entfernung des Formaldehyds zunächst zweimal für 15 min in 20 x SSC-Puffer (in DEPC-Wasser) zum Äquilibrieren gewaschen und mit einem Flüssigkeitsstrom auf die Membranen transferiert.

Eine sterile Wanne wurde ca. 3 cm hoch mit 20 x SSC Puffer gefüllt. Auf eine sterile Glasplatte wurden ca. 2 x 45 cm lange Whatman Papier-Streifen gelegt, die in das restliche SSC-Puffer-Reservoir hineinreichten. 4 - 5 Whatman-Papiere wurden in der erforderlichen Gelgröße auf die Glasplatte gelegt und das RNA-Gel aufgelegt. Darauf folgte die Nylonmembran, die wiederum mit 2 x Whatman Papier in Gelgröße bedeckt wurde. Eine 3 - 5 cm dicke Schicht mit Papiertüchern wurde mit einer beschwerten (1 kg) Glasplatte abgedeckt. Die Dauer des Transfers betrug 16 - 24 h bei RT. Danach wurde die Membran bei RT getrocknet, fixiert und bei 4 °C gelagert. Zur dauerhaften Fixierung der

RNS-Banden wurden die Banden mit einem UV-Transiluminator (254 nm) auf der Nylonmembran dauerhaft fixiert (UV-Shadowing).

### **2.13.18 Hybridisierung der Membran**

Es wurden 20 ml des Prähybridisierung-Puffers (High SDS-Hybridisierungs-Lösung) pro 100 cm<sup>3</sup>-Membran in ein DEPC-behandeltes Falcon-Tube gegeben. Die Prähybridisierung dauerte mindestens 1 h bei 68 °C. Anschließend wurde der Puffer verworfen und die Membran für die Hybridisierung weiterverwendet.

Die Hybridisierungen der mit homologen, DIG-markierten (Roche-Kit, Mannheim) RNS-Sonden erfolgte bei den Northern Blots bei 68 °C im Wasserbad in Falcon-Tubes. Die optimale Schmelztemperatur für die Oligonukleotide unter 50 bp wurde nach folgender Formel errechnet:  $T_M = 4\text{ °C} \times (G+C) + 2\text{ °C} \times (A+T)$  (-5 °C = optimale  $T_M$ ) (Wetmut, 1991). Die Konzentration der markierten RNS im Hybridisierungspuffer betrug 20 ng/ml. Nach einer Vorhybridisierung von 1 - 2 h wurde die markierte Sonde nach 10-min Hitze-denaturierung bei 95 °C im Wasserbad zugegeben. Danach wurde für 12 - 16 h hybridisiert. Anschließend wurde die Membran 2 x 5 min lang bei RT mit 2 x SSC-Puffer, der 0,1 % (w/v) SDS enthielt, und dann 2 x 15 min lang mit 0,5 x SSC-Puffer, der ebenfalls 0,1 % (w/v) SDS enthielt, bei 68 °C gewaschen.

### **2.13.19 Detektion der Sonde auf der Membran**

Die Lokalisierung der hybridisierten DNS erfolgte nach ihrer Inkubation mit einem Antikörper (alkalische Phosphatase) durch Chemilumineszenz nach Angaben des Kit-Herstellers (Roche, Mannheim) sowie durch Colorimetrie. Die colorimetrische Detektion erfolgte durch die Inkubation der Membran mit 5 ml Färbelösung folgender Zusammensetzung: Zu 10 ml DIG-Puffer 3 wurden 45 µl einer Lösung von 75 mg / ml 4-Nitro Blue Tetrazolium Chlorid (NBT) und 70 µl einer Lösung von 25 mg / ml 5-Brom-4-Chlor-2-Indolyl-Phosphat (BCPIP) gegeben. Der Färbeprozess setzte innerhalb weniger Minuten ein und war nach maximal 16 h abgeschlossen. Die hybridisierenden Plaques auf den Membranen wurden durch ihre violette Färbung sichtbar. Die Lage der Plaques auf der Membran wurde mit einem Bleistift dauerhaft markiert.

### **2.13.20 Auswertung der Sonden**

Zur Chemolumineszenz-Auswertung wurden die Membranen im Epichemie II Darkroom und die Intensität der amplifizierten Nukleinsäure-Fragmente über einen UVP Lumi-

Imager ermittelt. Die Größenunterschiede zwischen Target- und Standard-Nukleinsäure-Fragmenten wurden mit einem Faktor (Länge des Targets / Länge des Standards) korrigiert. Ein Markerabgleich mit einer definierten Standardauftragung und der ermittelte Rf-Wert (relative Mobilität) der Fragmente ließen eine Lokalisation und Größenangabe der gesuchten Fragmente zu.

## **2.14 Mikroskopische Methoden**

### **2.14.1 Fixierung isolierter Kardiomyozyten**

Unmittelbar nach ihrer Entnahme wurden die nativen Proben in eine mit Fixierlösung (s. 2.10.3) gefüllte Petrischale gegeben und für mindestens 1 h fixiert. Es folgte eine Zentrifugation (300 upm) der Zellen für 3 min, um sie erneut 1:1 mit dem Fixierpuffer zu versetzen. In diesem Zustand wurden die Zellen zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert. Bei längerer Lagerzeit wurden die Zellen statt mit der Fixierlösung mit einem Krebs-Hepes-Puffer (200 mM) dauerhaft gelagert (s. 2.10.3).

### **2.14.2 Lichtmikroskopie**

Die Untersuchungen auf Reinheit der Kulturen wurden an einem Photomikroskop mit Phasenkontrast (Zeiss West Universal, Oberkochen) mit RS III Filter durchgeführt. Zur Dokumentation wurde eine Canon A80 Digitalkamera mit 4 Mio. Pixel und ein T2-Photoadapter verwendet. Größenangaben wurden mit einem Messokular- und Messobjektträger ermittelt.

### **2.14.3 Elektronenmikroskopie**

Die Untersuchungen wurden an einem Elektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV durchgeführt (EM 10 Zeiss, Oberkochen). Die Dokumentation erfolgte auf Kodak Electron Image Film (So 163; 6,5 x 9 cm; Plano GmbH, Wetzlar). Von allen untersuchten Zellen mit unterschiedlicher pharmakologischer Behandlung wurden mindestens 30 Zellen betrachtet.

### **2.14.4 Fixierung, Entwässerung und Einbettung der Proben**

Die Zellen (s. 2.11.3) wurden für 1 min bei 2700 x g abzentrifugiert und das Pellet 2 x in EM-Puffer (s. 2.10.3) gewaschen. Die anschließende Fixierung erfolgte für 30 min in 5 % Glutaraldehyd in EM-Puffer. Nachfolgend wurde für 2 h mit 1 % Osmiumtetroxid nach-

fixiert. Nach 5 x 5-min Waschen in EM-Puffer folgte eine ansteigende Entwässerungsreihe in Aceton (15, 30, 45, 60, 75, 90 %; je 15 min). Danach wurden die Proben 3 x für 10 min in 100 % Aceton belassen und im Anschluss daran in ein Epoxidharz (= Transmit) überführt, wobei die Proben zuerst in Aceton / Transmit (1/1, v/v) für 20 min bei RT stehen gelassen wurden. Anschließend wurden die Proben in Aceton / Transmit im Verhältnis (1/2, v/v) überführt und über Nacht stehen gelassen. Nach Absaugen des Aceton / Transmit-Gemisches und Zugabe von Transmit (100 %) wurde 3 x für 1 h im Exsikkator entgast. Nach Überführen in Beem-Kunststoffkapseln (Roth, Karlsruhe) polymerisierten die Proben über Nacht in einem Trockenschrank bei 70 °C aus.

#### **2.14.5 Herstellung der Schnitte**

Die Ultradünnschnitte mit Schnittdicken von 60 - 80 nm wurden an einem Ultramikrotom (Ultracut S, Reichert, Wien) mit einem Diamantmesser (DuPont, Sontara) hergestellt. Die Schnitte wurden anschließend auf 200 mesh Nickelnetzchen (Plano, Marburg) übertragen und jeweils für 15 s mit Kaliumpermanganat (5 %) und für 30 s mit Bleicitrat (2 %) nachkontrastiert.

#### **2.14.6 Immunfluoreszenzfärbung kultivierter Kardiomyozyten**

Die Zellen (s. 2.11.3) wurden zunächst auf autoklavierte Flexiperm-Kautschuk-Kammern (Vivascience, Hannover) verteilt, die sich auf sterilisierten, mit Laminin beschichteten OTs befanden, und in Kulturschalen unter normalen Kulturbedingungen ausgesät. Zur Fluoreszenzanfärbung wurden dann behandelte und unbehandelte Zellen 2 x mit PBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen erfolgte eine Inkubation bei RT für 10 min mit 4 % (w/v) frischem Paraformaldehyd in PBS. Nach zwei erneuten Waschschrritten mit PBS erfolgte zur Permeabilisierung der Zellmembranen eine Inkubation für 10 min bei RT mit 0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS, danach wurde wieder 2 x mit PBS gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen wurden die Zellen für 1 h bei RT mit 1 % (w/v) BSA in PBS inkubiert und erneut mit PBS gewaschen. Zur Fluoreszenzanfärbung wurden die spezifischen Erst-Antikörper 'goat polyclonal IgG Anti-AQP1' oder 'Anti-AQP4' (Santa Cruz) 1:1000 in PBS verdünnt, zu den Zellen gegeben und diese für 16 h bei 6 °C inkubiert und 2 x mit PBS gewaschen. Zur Isotypenkontrolle wurden Zellen ohne Antikörper-Auftragung mitbehandelt. Anschließend wurden die in PBS-verdünnten, Fluoreszenz-gekoppelten zweiten Antikörper 'donkey anti goat IgG' Texas Red/oder FITC (Santa Cruz Biolabs, Heidelberg) 1:500 zu den Zellen gegeben und diese für 2 h

bei RT lichtgeschützt inkubiert und 2 x mit PBS gewaschen. Die Deckblättchen wurden getrocknet und mit Fluoreszenz-geeignetem Medium (DAKO, Hamburg) auf einem Objektträger eingedeckt. Das Fixierpräparat wurde schließlich getrocknet und bei 4 °C bis zur Analyse lichtfrei gelagert.

#### **2.14.7 Konfokale Laserscanmikroskopie**

Fixierpräparate (s. 3.1.1) Immunfluoreszenz-gefärbter Kardiomyozyten wurden mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning Systems (Zeiss LSM 150, Oberkochen) mit einem Argon-Laser an einem inversen Axiovert-Mikroskop 100 analysiert. Die Bilder wurden durch Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm und einer Emission von  $530 \pm 10$  nm (grün) und  $> 585$  nm (rot) erzeugt. Es wurden nur Präparate verglichen, die in allen Parametern gleich behandelt wurden. Dazu zählten: Lasereinstellung, Filtereinstellung, Linsen, Spannung des Photomultipliers, Anzahl der akkumulierten Scanvorgänge, Formatgröße und Zoom-Einstellung sowie Scan-Geschwindigkeit und Z-Schritt-Größe. Bevorzugungen während der Bildauswahl wurden vermieden. Die Bilder der Zellen wurden mit Hilfe der Zeiss-Mikroskop-Software (Bio-Image, Oberkochen) erstellt, wobei die Kontrollzellen zur Isotypenkontrolle verwendet wurden.

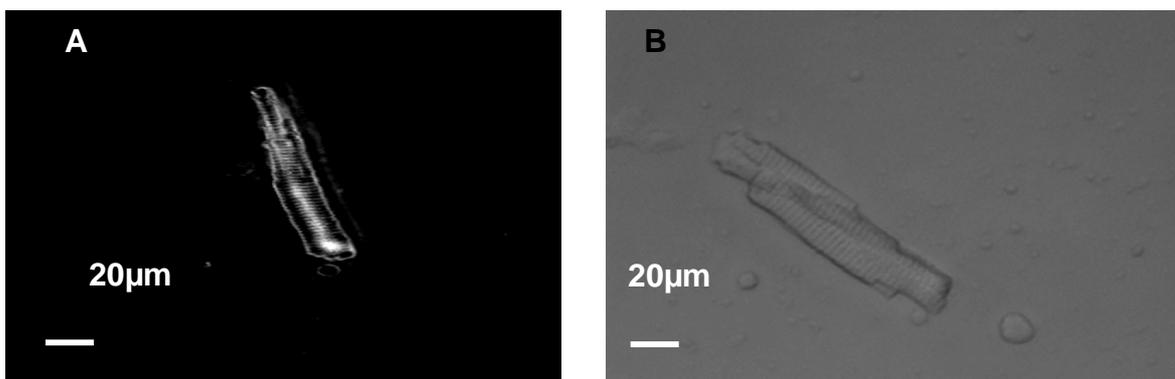
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Kardiomyozyten-Charakterisierung

Da  $\text{Ca}^{2+}$ -tolerante, von humoralen Faktoren freie, frisch isolierte, adulte Kardiomyozyten und Primärkulturen von diesen Zellen bislang für die Untersuchung der Aquaporin-Expression nicht verwendet wurden, werden nachfolgend einige ihrer Charakteristika beschrieben. Die Befunde dokumentieren die morphologische und biochemische Integrität isolierter Kardiomyozyten und bilden den Hintergrund für die durchgeführten Studien zur Aquaporin-Wirkung und -Funktion.

##### 3.1.1 Vitalität und Energiezustand isolierter Kardiomyozyten

Die enzymatische Dissoziation von adulten Ventrikeln in isolierte Zellen lehnte sich an die Methode von Berry (Berry et al., 1970) und Modifikationen nach Dow (Dow et al., 1981) an. Bei den meisten Techniken resultieren  $\text{Ca}^{2+}$ -intolerante Zellpopulationen mit geringer Anfangsvitalität und niedriger Haltbarkeit bei physiologischen Temperaturen. Die verwendete kombinierte Kollagenase / Trypsin-Dissoziationsmethode eliminierte diese Nachteile und erfüllte die im Hinblick auf Expressionsstudien besonderen Anforderungen an eine Zellpräparation. Die durchschnittliche Ausbeute betrug  $10 - 14 \times 10^6$  Kardiomyozyten pro Kaninchenherz, und die Anfangsvitalität lag bei  $80 \pm 9 \%$  ( $n = 36$ ). Systematische Untersuchungen zeigten, dass Vitalität und Ausbeute der Zellen in erster Linie von der Qualität und der Einwirkzeit der verwendeten Kollagenase abhängig waren.



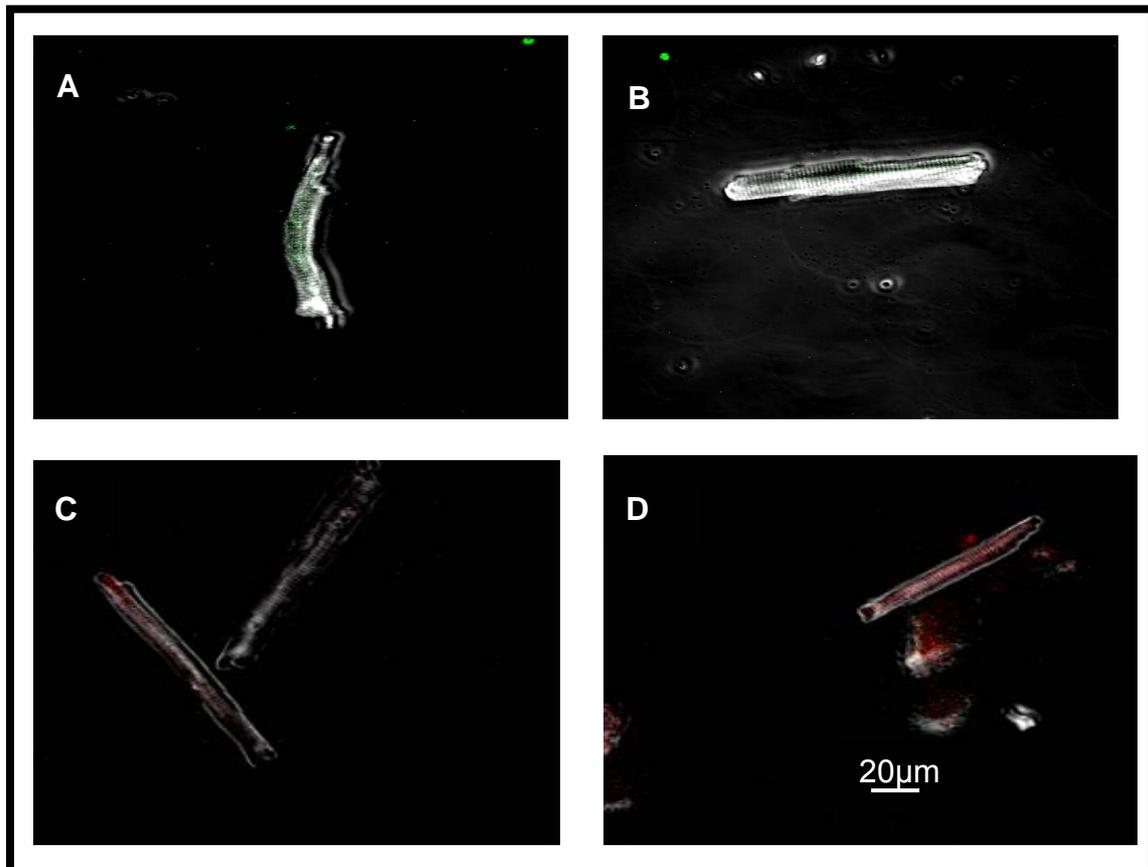
**Abb. 4: Lichtoptische Übersicht eines Kardiomyozyten nach dem letzten Waschvorgang**

*Bild A Achromat 40x Zeiss / 0,6 ; Ph 2 ; 15x CPL-Okular Phasenkontrastaufnahme*

*Bild B Achromat 40x Zeiss / 0,6 ; 15x CPL-Okular*

*Deutlich ist die für Kardiomyozyten typische Struktur zu erkennen.*

Durch die Präparation wurden im wesentlichen Fremdzellen eliminiert. Die Kardiomyozyten waren stäbchenförmig und zylindrisch und hatten eine deutlich erkennbare Querstreifung (Abb. 4). Nur wenige abgerundete Zellen wiesen deutliche Alterationen der Feinstruktur auf (nicht gezeigt). Fluoreszenz-markierte Antikörper (FITC und Texas Red) gegen AQP1 und AQP4 wiesen das Vorhandensein der AQP1 und 4 Wasserkanalproteine in Kardiomyozyten nach (Abb. 5).



**Abb. 5: Konfokale Laser-Scan-Aufnahmen isolierter Kardiomyozyten**

*Bild A und B mit anti-AQP1 goat polyclonal IgG; Immunmarkierung mit donkey anti goat IgG FITC (Santa Cruz, Heidelberg)*

*Bild C und D mit anti-AQP4 goat polyclonal IgG, Immunmarkierung mit donkey anti goat IgG Texas Red (Santa Cruz, Heidelberg)*

*Bild A und B bei einer Laseranregung von 530 nm*

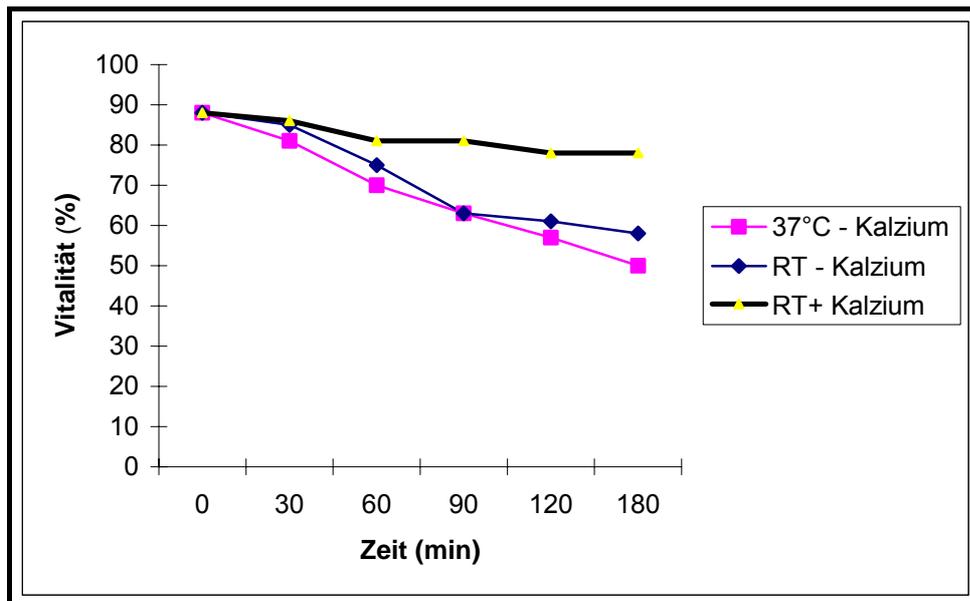
*Bild C und D bei einer Laseranregung von 585 nm*

*Achroplan 40x / 0,6 corr Ph2 10 x C-Okular*

*Der Skalierungsbalken in Bild D gilt für alle abgebildeten Aufnahmen*

### 3.1.2 Ca<sup>2+</sup>-Toleranz isolierter Kaninchen-Kardiomyozyten

Die anfängliche Vitalität der Zellpopulationen nahm nach Inkubation bei 37 °C über den 3-h Beobachtungszeitraum von 88 % auf 55 % ab (Abb. 6). Eine Inkubation bei RT und in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> (final 1 mM) führte lediglich zu einer tendenziell verbesserten Erhaltung der Vitalität (88 % auf 60 %). In Gegenwart von Kalzium bei RT blieben die Zellen über den 3-h Beobachtungszeitraum signifikant stabiler (88 % auf 78 %).



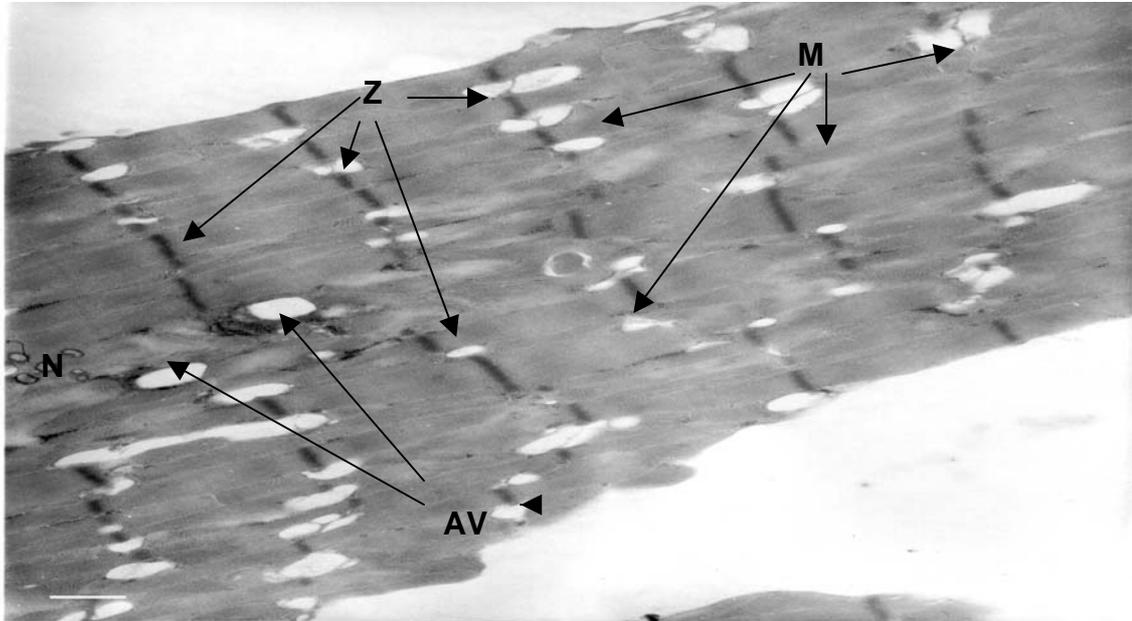
**Abb. 6: Einfluss von Kalzium und Temperatur auf die Vitalität isolierter Myozyten**

Angegeben sind Mittelwerte von jeweils 10 separaten Experimenten.

### 3.1.3 Morphologie

Die elektronenmikroskopische Untersuchung frisch isolierter Kardiomyozyten ergab eine Übereinstimmung der ultrastrukturellen Merkmale isolierter Zellen mit intaktem Herzwert (McNutt and Fawcett, 1976). Kern, Mitochondrien, Myofibrillen, Sarkolemma und sarkoplasmatisches Retikulum zeigten eine normale Morphologie. Die reguläre Organisation der Sarkomere und der Verlauf der Z-Linie waren deutlich erkennbar (Abb. 7). Im Querschnitt wurde die unveränderte klassische Anordnung (nicht dokumentiert) von Aktin und Myosin deutlich (Dispersyn et al., 2001). Unterschiede ergaben sich nach Überführung der Zellen in eine Primärkultur. Neben intakten Kardiomyozyten in den Kontrollen, die allerdings immer über- bis hyperkontrahiert vorlagen, wurden in den Primärkulturen deutlich sichtbare Dedifferenzierungen erkennbar (Abb. 8 A und 8 B). Die Mitochondrien waren in der Regel intakt. Nach einer längeren Verweildauer der Zellen in

Kultur (24 h) und nach induzierter pharmakologischer Ischämie durch NaCN-Glukose fanden sich auch Zellen mit intrazellulären Ödemen. In der Regel waren auch die Mitochondrien stark angeschwollen (Abb. 8 C und 8 D).

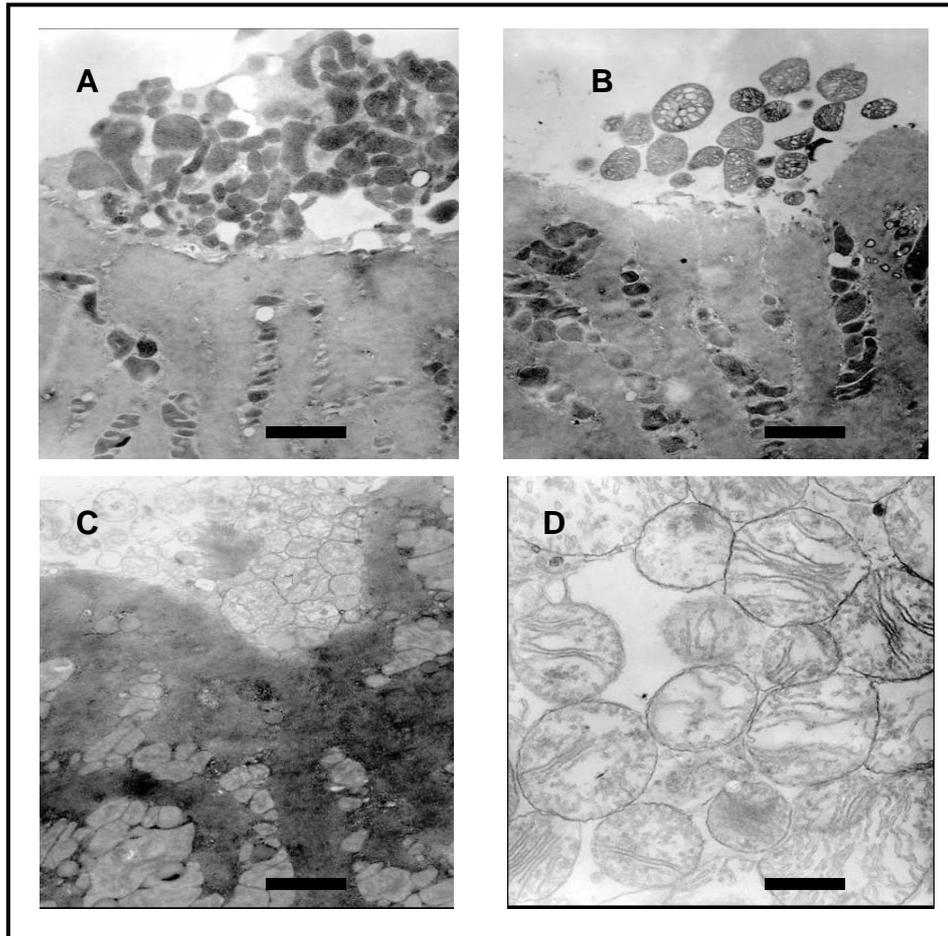


**Abb. 7: Intakter Kardiomyozyt unter Kontrollbedingungen**

*AV: Autophagie-Vakuolen; M: Mitochondrien; N: Nucleolus; Z: Z-Scheibe  
Skalierung links unten entspricht 1  $\mu$ m*

### 3.1.4 Vitalität und Energiezustand kultivierter Kardiomyozyten

Langzeitstudien zur Regulation und zur Proteinexpression sind nur an kultivierten Zellen möglich. Drei Stunden nach der Aussaat waren die stäbchenförmigen Zellen maximal angeheftet; abgerundete Zellen zeigten keinerlei Anhaft-Tendenz. Das Waschen der Kulturschalen führte zur vollständigen Entfernung der abgerundeten Zellen und zu einer Population von 100 % stäbchenförmigen Zellen. Die anfängliche Vitalität verringerte sich während der Kulturphase (Abb. 6) Eine Minderversorgung während der Inkubation führte zu einer Abnahme der Zellzahl pro Kulturschale.



**Abb. 8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen isolierter Kardiomyozyten**

**Oben:** Kontrolle nach 1 h in Primärkultur;

Über- bis hyperkontrahierte Kardiomyozyten mit intakten Mitochondrien, die teils außerhalb der Zelle liegen. A: orthodoxes Stadium, B: kondensiertes Stadium nach Schmidl (Med. Hochschule Hannover) mündl. Kommunikation

**Unten:** nach 24 h in Kultur

C: Kontraktionsbande mit stark geschädigten Mitochondrien und Ödemen

D: geschwollene Mitochondrien mit Matrix- und Cristaeverlusten nach induzierter Ischämie  
Skalierungsbalken Bild A; B; C entspricht 1  $\mu\text{m}$ ; im Bild D entspricht er 0,5  $\mu\text{m}$

### 3.2 Charakterisierung der Membran-Fractionen

Über die Gradientenzentrifugation ließen sich die verschiedenen Membrankompartimente (Plasmamembranen und mikrosomale Membranen) lokalisieren und untersuchen, ob eine Translokation der Wasserkanalproteine AQP1 und AQP4 erfolgt war.

### **3.2.1 Plasmamembran-Fraktion**

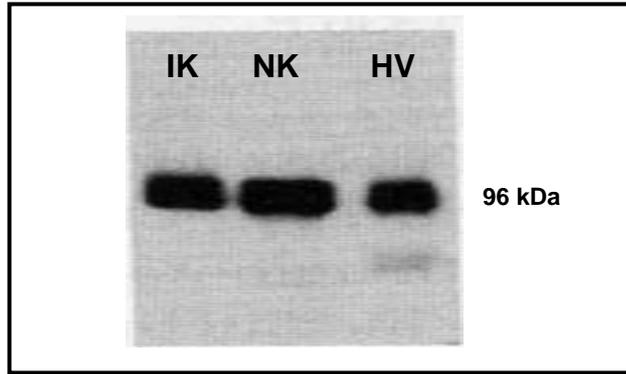
Die in der Plasmamembran lokalisierte Ouabain-sensitive  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ist ein sarkomales Protein, dessen Verwendung als Leitenzym für Plasmamembranen seit langem etabliert ist (Jones et al., 1980). Im Saccharosegradienten (0,6 M) fanden wir eine Fraktion mit einer Ouabain-sensitiven  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Aktivität, die in Übereinstimmung mit der Literatur als Plasmamembran-Fraktion definiert wurde (Kolter et al., 1992).

### **3.2.2 Mikrosomale-Membran-Fraktion**

Die weiteren Gradientenfraktionen zeigten die niedrigste Ouabain-sensitive  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Aktivität und wurden als mikrosomale Membranen und Vesikel definiert (Uphues et al., 1994). Weitere Charakterisierungen der Membran-Fraktionen ergaben sich durch die Expression der Ouabain-sensitiven  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase auf der Plasmamembran mittels spezifisch auf Ouabain-sensitive  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase gerichtete monoklonale Antikörper (Fuller et al., 2001).

## **3.3 Expression der Ouabain-sensitiven $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase**

Als Nachweis der Expression der Ouabain-sensitiven  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase dienten Rohmembran-Fraktionen aus frisch isolierten adulten Kaninchen-Kardiomyozyten und humanes Ventrikelhomogenat. Nach subzellulärer Fraktionierung und Auftrennung der Membrankompartimente auf ein 12 % SDS-Gel wurden die Unterschiede in der Expression der Ouabain-sensitiven  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in den Membran-Fraktionen detektiert. Die mit Hilfe des Maus-monoklonalen IgG Anti- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Antikörpers  $\alpha$ -1 auf der Western-Blot-Membran detektierten Proteine verschiedener subzellulärer Fraktionen wurden als Marker für den Reinheitsgehalt der subzellulären Fraktion verwendet. In den isolierten Kaninchen-Kardiomyozyten und dem humanen Ventrikelgewebe wurde ein 96 kDa großes Protein detektiert (Abb. 9). Dieses Proteinsignal wurde ausschließlich in den Plasmamembran-Fraktionen detektiert. Die Größe des Proteinsignals korrelierte mit dem Ouabain-sensitiven- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Protein in der Literatur. Das Vorhandensein von AQP1 oder AQP4 auf der Plasmamembran konnte nach der methodischen Lokalisation der Plasmamembran mit geeigneten Antikörpern gegen AQP1 und AQP4 untersucht werden.



**Abb. 9: Nachweis der Ouabain-sensitiven  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase**

Western-Blot auf PVDF-Membran von verschiedenen Proben. Deutliches Signal des monoklonalen Antikörpers bei 96 kDa als Charakteristikum einer Plasmamembran-Fraktion.

**IK:** ischämische Plasmamembran des Kaninchenmyokards

**NK:** normoxische Plasmamembran des Kaninchenmyokards

**HV:** humanes Ventrikelgewebe

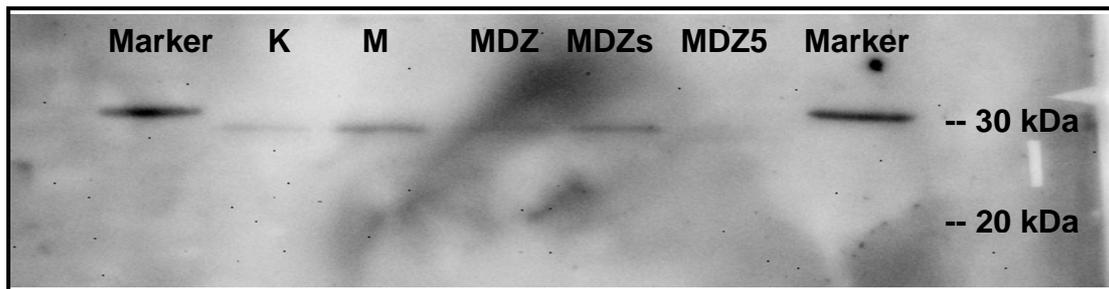
### 3.4 Expression von AQP1 und pharmakologische Induktion

Die in der Literatur für unterschiedliche Spezies und Gewebetypen angegebenen Molekulargewichte von AQP1 wurden zum Vergleich herangezogen (Agre et al., 1993; Nielsen et al., 1993; King et al., 1996; Nielsen et al., 1997a; Burghardt et al., 2003; Birkenkamp-Demtröder et al., 2003). Der Anti-AQP1-Antikörper L-19 (sc-878; Santa Cruz Biolabs, Heidelberg) erwies sich für die weiteren Aufschlüsse für die Detektion des AQP1-Proteins am besten geeignet.

In der Rohmembran-Fraktion der isolierten adulten Kaninchen-Kardiomyozyten und in den mikrosomalen Membran-Fractionen wurden deutliche Signale bei 23 kDa detektiert (Abb. 10). Damit lag das AQP1-Protein nahe dem in der Literatur beschriebenen Molekulargewicht für AQP1 in anderen Gewebetypen und Spezies (Zeidel et al., 1992; Nielsen et al., 1993; Hasegawa et al., 1994a; Burghardt et al., 2003). Bei der Quantifizierung der AQP1-Expression an isolierten Kaninchen-Kardiomyozyten wurden für alle Versuchsgruppen (nach Protokoll; s. 2.11.6) keine AQP1-Signale in den Plasmamembran-Fractionen detektiert.

Die AQP1-Protein-Expression in der mikrosomalen Membran war bei den adulten Kaninchen-Kardiomyozyten nach pharmakologisch induzierter Ischämie gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (Abb. 11). Bei Aktivierung der mitochondrialen- $\text{K}_{\text{ATP}}$ -abhängigen-

K<sup>+</sup>-Kanäle mit Diazoxid blieb während der induzierten Ischämie die AQP1-Expression gegenüber der Kontrollgruppe unverändert. Wurde die Öffnung der mitochondrialen-K<sub>ATP</sub>-abhängigen-K<sup>+</sup>-Kanäle antagonisiert (5-HD), war die AQP1-Expression nur leicht erhöht (Abb. 11). Die späte Aktivierung der mitochondrialen-K<sub>ATP</sub>-abhängigen-K<sup>+</sup>-Kanäle nach metabolischer Inhibierung der Kardiomyozyten führte zu einer tendenziellen Erhöhung der AQP1-Expression. Daraus lässt sich schließen, dass Diazoxid über ein entsprechendes Zeitfenster verfügen muss, um die mitochondrialen-K<sub>ATP</sub>-abhängigen-K<sup>+</sup>-Kanäle während einer Inhibierung zu aktivieren.



**Abb. 10: Expressions von AQP1 in der mikrosomalen Membran; Beispielblot**

Western-Blot; PVDF-Membran Low Molecular Marker, Bio-Rad

**K:** Kontrolle

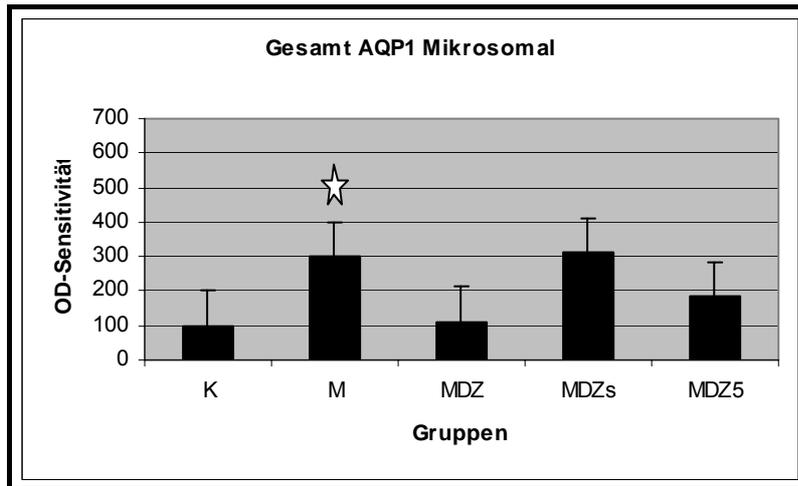
**M:** pharmakologische Ischämie

**MDZ:** Diazoxid und pharmakologische Ischämie

**MDZs:** pharmakologische Ischämie und Diazoxid nach 25 min

**MDZ5:** pharmakologische Ischämie; Diazoxid und Antagonist des Kanalöffners

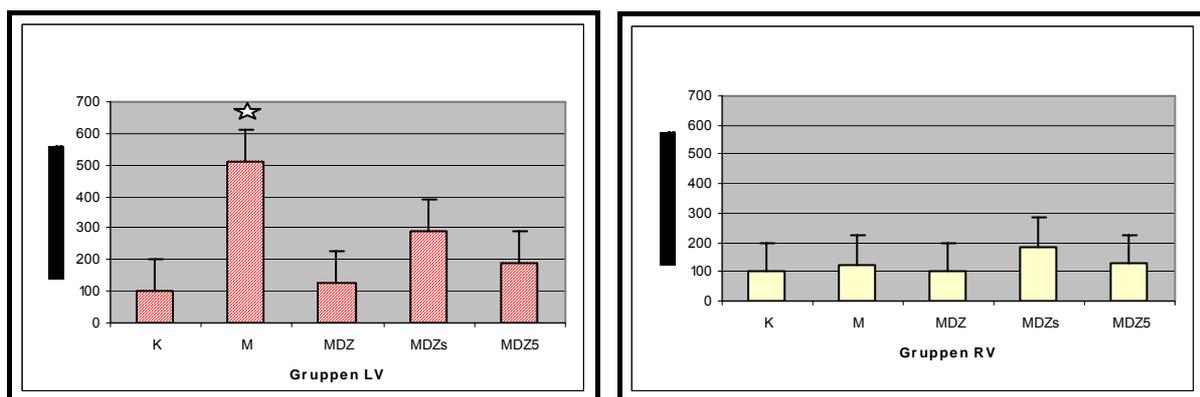
Nomenklatur gilt für alle weiteren Proteinauflösungen der pharmakologischen Induktion



**Abb. 11: Mikrosomale-Membran-Fractionen auf AQP1**

Die OD (optical density) war während der metabolischen Inhibierung (**M**, induzierte Ischämie) bei der mikrosomalen AQP1-Fraktion signifikant erhöht. In der späten Aktivierungsphase der mitochondrialen-K-ATP-Kanäle durch Diazoxid (**MDZs**) war die AQP1-Expression tendenziell erhöht

Das spezifische AQP1-Protein-Signal wurde an Kardiomyozyten bestätigt, welche nur vom rechten oder nur vom linken Ventrikel stammten. Somit ließen sich die in der mikrosomalen-Membran-Fraktion ermittelten Expressionssignale für das AQP1-Protein (Abb. 12) differenzierter den einzelnen Ventrikeln zuordnen (n = 12).



**Abb. 12: Ventrikelaufschlüsse im Hinblick auf die AQP1-Protein-Expression**

**K:** Kontrolle

**M:** pharmakologische Ischämie

**MDZ:** Diazoxid und pharmakologische Ischämie

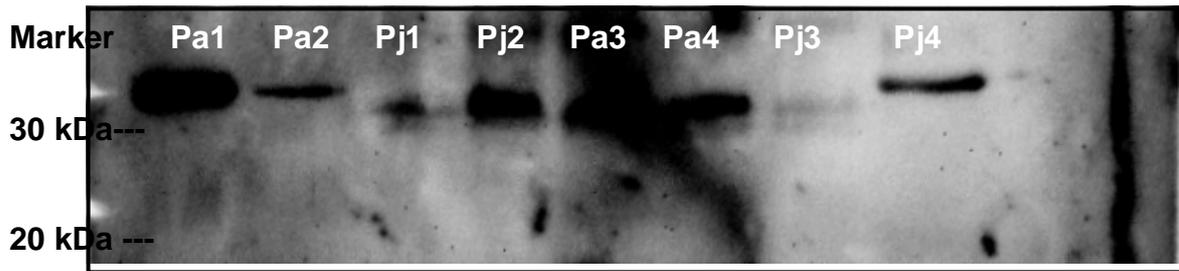
**MDZs:** pharmakologische Ischämie und Diazoxid nach 25 min

**MDZ5:** pharmakologische Ischämie; Diazoxid

Die Differenzierung zeigt, dass die in Abb. 12 (links) gezeigten Ergebnisse ganz überwiegend durch den linksventrikulären Zell-Aufschluss zustande kamen, denn der rechtsventrikuläre Zell-Aufschluss zeigte eine gleich bleibende Expression des AQP1-Proteins in allen Versuchsgruppen (Abb. 12, rechts). Die AQP1-Expression im linken Ventrikel der mikrosomalen Kaninchen-Kardiomyozyten war nach induzierter pharmakologischer Ischämie signifikant erhöht. Ebenso ergab sich eine tendenzielle Erhöhung der AQP1-Protein-Expression in der späten mitochondrialen- $K_{ATP}$ -abhängigen-Kaliumkanäle-Aktivierung im linken Ventrikel.

Bisher wurde für einige Spezies die Lokalisation des AQP1-Proteins innerhalb der Plasmamembran beschrieben (Preston and Agre, 1991; Zeidel et al., 1992; Jung et al., 1994b; Lee et al., 1997; Burghardt et al., 2003). Bei den von uns untersuchten Kaninchen-Kardiomyozyten konnte AQP1 nur intrazellulär in den mikrosomalen Membranen detektiert werden.

**Expression von AQP1 in humanem Gewebe.** Dieses Modell zeigt den *in vivo* Status der AQP1-Expression in einem nicht extern stimulierten und induzierten Ventrikel. Die humanen Herzventrikel-Gewebeproben (n = 16) stammten von DCM-Patienten, Patienten mit cerebralen Traumen oder nach plötzlichem Herztod (Unit of Pharmacology and Therapeutics, University of Louvain Medical School, Brussels). Es wurden AQP1-Proteine (28 kDa) in den Plasmamembran-Fractionen der subzellulären Fraktionierung des humanen Herzgewebes detektiert (Abb. 13). Innerhalb der humanen mikrosomalen-Fraktion lag das AQP1-Protein nicht vor. Damit differierte der Lokalisationsort für das AQP1-Protein zwischen Kaninchen und Mensch.



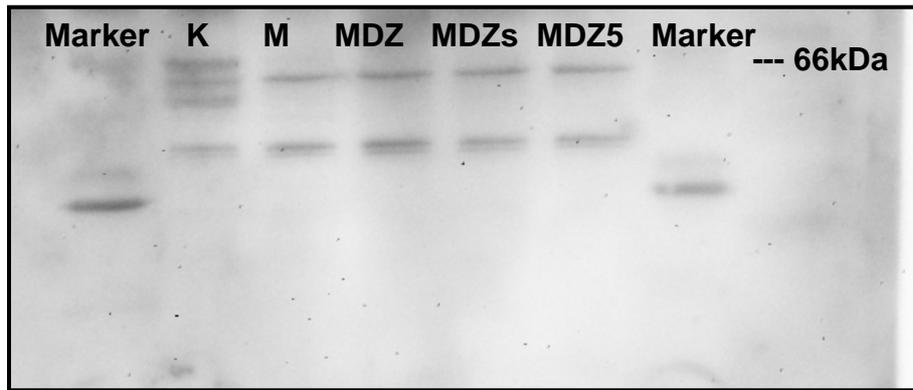
**Abb. 13: Humane subzelluläre Fraktionierung**

*Repräsentative Gewebeprobe zur plasmamembranären AQP1-Protein Detektion  
Western-Blot auf PVDF-Membran Broad Molecular Marker Bio-Rad  
Apikale und linksventrikuläre juvenile und adulte humane Ventrikelaufschlüsse mit  
Anti-AQP1-AK und Detektionssignale bei 28 kDa.  
P: Patient; a: adult; j: juvenil; Nr. 1 – 4 unterschiedliche Patienten*

### 3.5 Expression von AQP4 und pharmakologische Induktion

Die Daten aus den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen halfen bei der Auswahl der geeigneten Anti-AQP4-Aks (Shi et al., 1995; Terris et al., 1995; Frigeri et al., 1995b; Lu et al., 1996; Misaka et al., 1996; Yang et al., 1997; Nagelhus et al., 1998; Amiry-Moghaddam et al., 2003; Birkenkamp-Demtröder et al., 2003). Der Anti-AQP4-Antikörper C-19 (sc-9888; Santa Cruz Biolabs, Heidelberg) erwies sich für die Detektion des AQP4-Proteins am besten geeignet.

**AQP4-Expression an Kaninchen-Kardiomyozyten.** In den Plasmamembran-Fractionen wurden keine AQP4-Signale detektiert. Im Gegensatz dazu wurden in der mikrosomalen Membran-Fraktion deutliche Signale bei 43 kDa mittels Anti-AQP4-Antikörper detektiert (Abb. 14). Damit lag das AQP4-Protein nahe an den in der Literatur beschriebenen Molekulargewichten für AQP4 in anderen Gewebetypen und Spezies (Shi et al., 1995; Frigeri et al., 1995b; Lu et al., 1996; Amiry-Moghaddam et al., 2003).



**Abb. 14: Anti-AQP4 Expressions-Signale bei Kaninchen-Kardiomyozyten**

Auswahl eines Blots für die Detektionssignale auf anti-AQP4-AK mikrosomalen Fraktion bei 43 kDa. Western-Blot auf PVDF-Membran Low Molecular Marker, Bio-Rad

**K:** Kontrolle; **M:** pharmakologische Ischämie

**MDZ:** Diazoxid und pharmakologische Ischämie

**MDZs:** pharmakologische Ischämie und Diazoxid nach 25 min

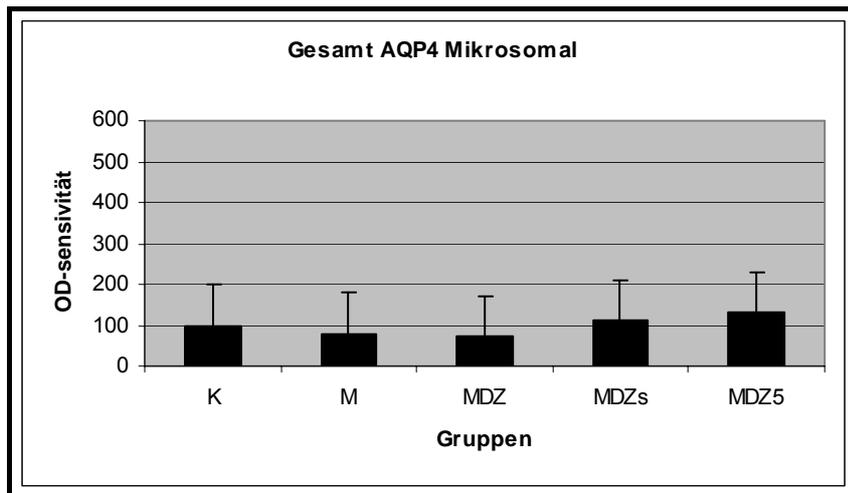
**MDZ5:** pharmakologische Ischämie; Diazoxid

Die Expression des AQP4-Proteins in der mikrosomalen Membran war nach allen Versuchsgruppen-Interventionen gegenüber Kontrolle nicht erhöht ( $n = 12$ ). Auch die Aktivierung der mitochondrialen- $K_{ATP}$ -abhängigen- $K^+$ -Kanäle führte während einer Inhibition zu keiner gegenüber Kontrolle veränderten AQP4-Expression. In Anwesenheit des Antagonisten 5-HD war die AQP4-Expression gegenüber Kontrolle nicht verändert. Die metabolischen Veränderungen durch pharmakologische Induktion führten in den mikrosomalen Membranen isolierter Kaninchen-Kardiomyozyten zu keiner Veränderung der AQP4-Expression (Abb. 15).

Weitere Aufschlüsse zur Ermittlung des AQP4-Protein-Expressionsortes erfolgten nach Quantifizierung der aufgereinigten, getrennt detektierten Ventrikelaufschlüsse. Das AQP4-Protein-Signal wurde zusätzlich ausschließlich für mikrosomale-Fractionen links- und rechtsventrikulärer Kardiomyozyten bestimmt.

Es ergaben sich für die beiden Ventrikel keine signifikanten Unterschiede und damit auch keine Unterschiede gegenüber der Rohmembran-Fraktion (Abb. 16).

Erstmalig wurde das AQP4-Protein für das Kaninchen-Myokard beschrieben. Neben den für AQP4 typischen 43 kDa-Banden wurden mehrfach Signale von weiteren positiven Banden unterschiedlichen Molekulargewichtes detektiert, was auf unterschiedliche AQP4-Isoformen schließen lässt (Ma et al., 1998; Yang et al., 1995).



**Abb. 15: Rohmembran-Fraktionen auf Anti-AQP4**

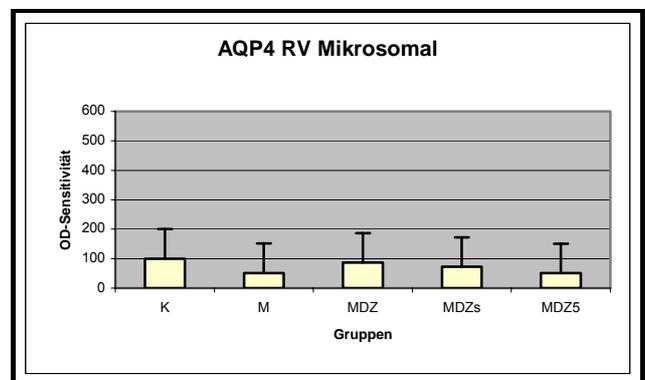
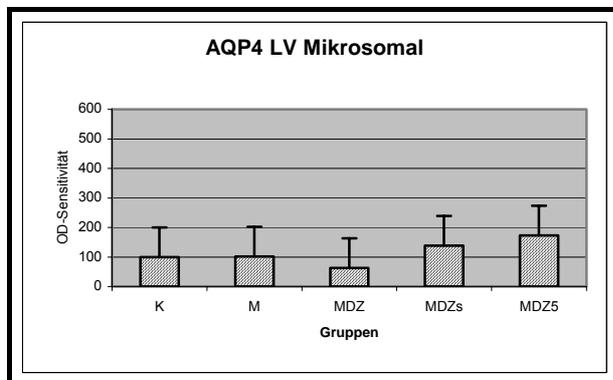
Bei allen Versuchsgruppen ergaben sich nach pharmakologischer Induktion im Vergleich zur Kontrollgruppe keine wesentlichen Änderungen

**K:** Kontrolle; **M:** pharmakologische Ischämie

**MDZ:** Diazoxid und pharmakologische Ischämie

**MDZs:** pharmakologische Ischämie und Diazoxid nach 25 min

**MDZ5:** pharmakologische Ischämie; Diazoxid



**Abb. 16: Ventrikelaufschlüsse in Hinblick auf die AQP4-Protein-Expression**

**K:** Kontrolle; **M:** pharmakologische Ischämie

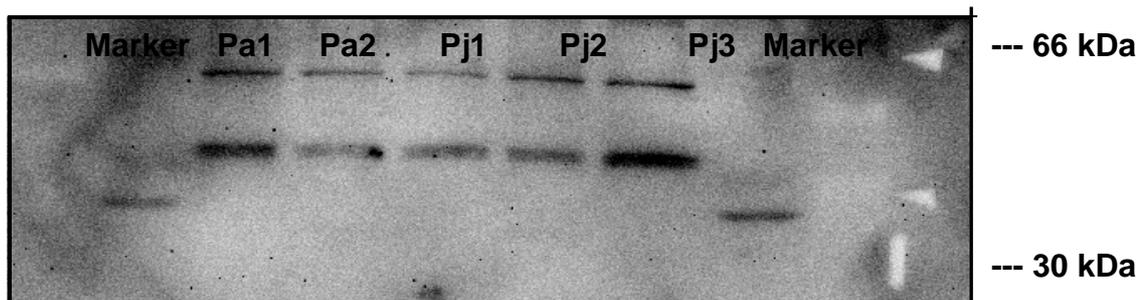
**MDZ:** Diazoxid und pharmakologische Ischämie

**MDZs:** pharmakologische Ischämie und Diazoxid nach 25 min

**MDZ5:** pharmakologische Ischämie; Diazoxid

**AQP4-Expression in humanem Gewebe.** Dieses Modell zeigt den *in vivo* Status der AQP4-Expression in einem nicht extern stimulierten und induzierten Ventrikel. Die humanen Herzventrikel-Gewebeproben (n = 16) stammten von DCM-Patienten, Patien-

ten mit cerebralen Traumen oder nach plötzlichem Herztod (Unit of Pharmacology and Therapeutics, University of Louvain Medical School, Brussels, und Herz- und Diabeteszentrum NRW, Bad Oyenhausen). Es wurden AQP4-Proteine (43 kDa) in den mikrosomalen-Fractionen der subzellulären Fraktionierung des humanen Herzgewebes jedoch nicht innerhalb der Plasmamembran-Fraktion detektiert (Abb. 17). Damit war der Lokalisationsort der membranständigen Wasserkanalproteine AQP1 und AQP4 bei Kaninchen und Menschen unterschiedlich.



**Abb. 17: Humane subzelluläre Fraktionierung auf anti-AQP4-AK**

*Western-Blot auf PVDF-Membran Low Molecular Marker Bio-Rad*

*Apikaler und linksventrikulärer Ventrikelaufschluss der mikrosomalen-Membran auf Anti-AQP4 von juvenilen und adulten Patienten bei 43 kDa.*

*P: Patient; a: adult; j: juvenil; Nr. 1 - 3 unterschiedliche Patienten*

*Weitere Banden nach AQP4-AK-Immunpräzipitation im humanen Gewebe verschiedener AQP4-Isoformen sichtbar.*

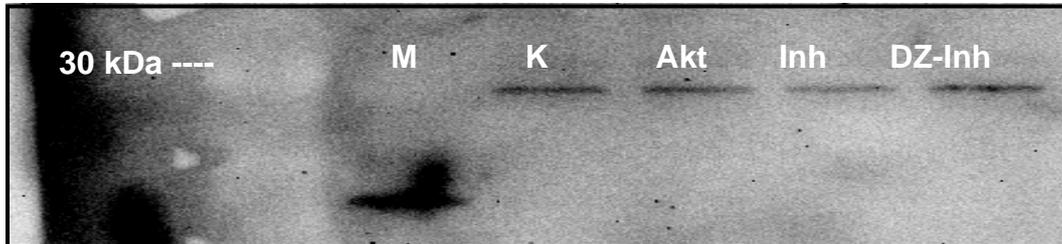
Auch im humanen Gewebe wurde neben der 43 kDa-Bande ein weiteres auf anti-AQP4-AK positives Bandensignal mit einem anderen Molekulargewicht ermittelt. In der Literatur sind bereits mehrere AQP4-Isoformen sowohl in humanen als auch für andere Spezies (außer Kaninchen-Myokard) dokumentiert (Ma et al., 1998; Umenishi and Verkman, 1998; Neely et al., 1999; Sobue et al., 1999; Furman et al., 2003; Silberstein et al., 2004).

### 3.6 Effekte der Proteinkinase-C (PKC) auf die kardiale AQP-Expression

#### 3.6.1 Effekte der PKC auf die AQP1-Expression

Die AQP1-Expression in isolierten Kaninchen-Kardiomyozyten war nach allen Protokollen gegenüber Kontrolle signifikant vermindert (Abb. 18). Zur genaueren Differenzierung schwacher Expressionssignale wurden Kardiomyozyten von beiden Ventrikeln

einzelnen aufgeschlossen (Abb. 19). Die Aktivierung der PKC durch den Phorbol-ester verminderte die AQP1-Expression. Es kam jedoch nicht zu einer Translokation von AQP1-Wasserkanälen.

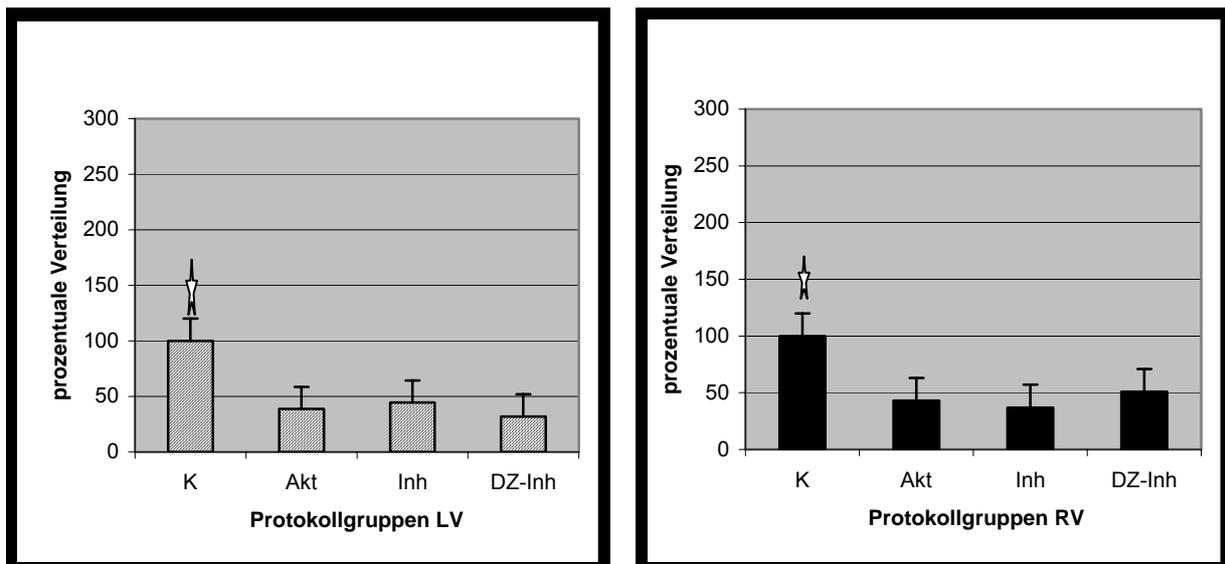


**Abb. 18: Charakterisierung der AQP1-Expression in Kaninchen-Kardiomyozyten**

Western-Blot auf PVDF-Membran Broad Molecular Marker, Bio-Rad

**M:** Marker; **K:** Kontrolle; **Akt:** Phorbol-ester PMA; **Inh:** Antagonist zum Phorbol-ester;

**DZ-Inh:** Vortriggerung mit Diazoxid vor PKC-Aktivierung



**Abb. 19: AQP1-Protein-Expression nach PKC-Protokoll Aufschluss**

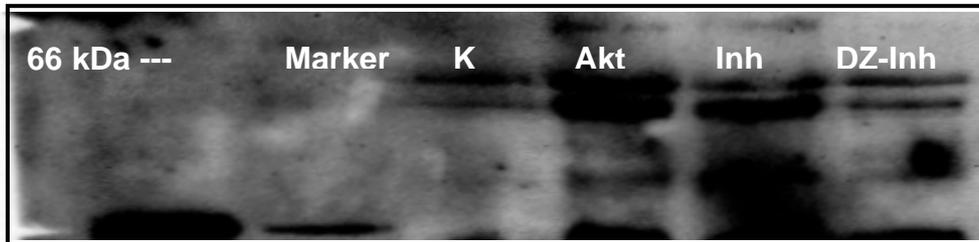
Alle Protokollgruppen der ventrikulären Aufschlüsse fanden unter gleichen Inkubationsbedingungen statt. Pro Zell-Gruppen-Aliquot wurden  $3 \times 10^6$  Zellen verwendet. Alle Gruppen zeigten eine signifikante Erniedrigung der AQP1-Expression gegenüber der Kontrollgruppe.

**K:** Kontrolle; **Akt:** Phorbol-ester; **Inh:** Antagonist zum Phorbol-ester; **DZ-Inh:** Vortriggerung mit Diazoxid vor PKC-Aktivierung

### 3.6.2 Effekte der PKC auf die AQP4-Expression

Die AQP4-Expression isolierter Kaninchen-Kardiomyozyten war während der Aktivierung der PKC mit PMA gegenüber den anderen Versuchsgruppen erhöht (Abb. 20). Zur

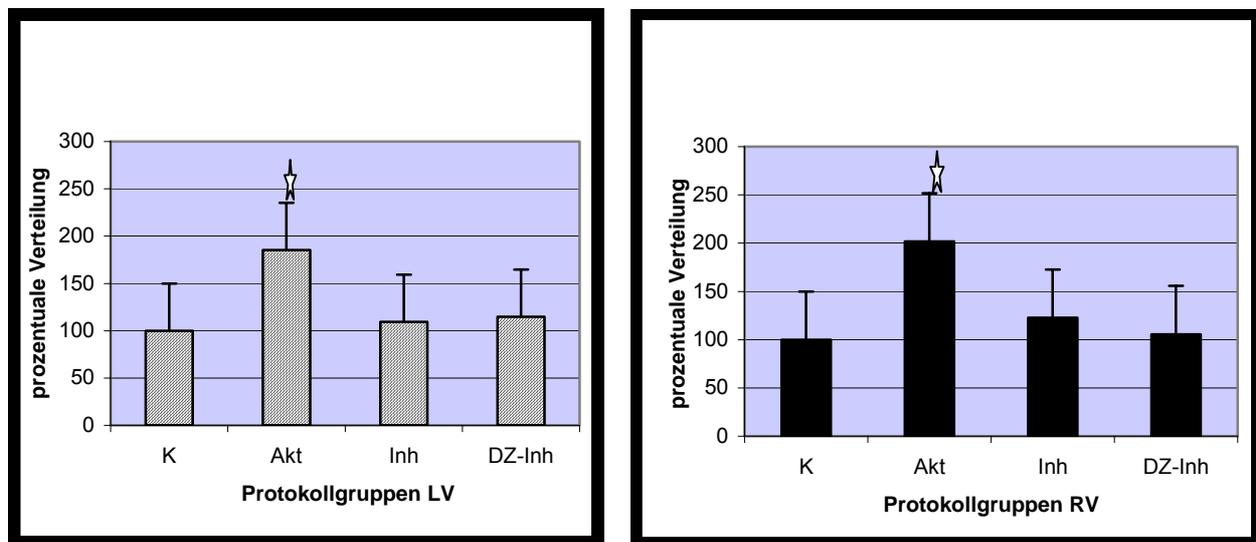
genaueren Differenzierung schwacher Expressionssignale wurden wiederum Kardiomyozyten von beiden Ventrikeln einzeln aufgeschlossen. Die Aktivierung der PKC durch PMA verursachte eine signifikante Erhöhung der AQP4-Protein-Expression in beiden Ventrikeln (Abb. 21).



**Abb. 20: Charakterisierung der AQP4-Expression**

Western-Blot auf PVDF-Membran Broad Molecular Marker, Bio-Rad

**K:** Kontrolle; **Akt:** Phorbol ester; **Inh:** Phorbol ester Antagonist; **DZ-Inh:** Vortriggerung mit Diazoxid vor PKC-Aktivierung. Die AQP4-AK-Immunpräzipitation zeigte drei Banden mit unterschiedlichen Molekülmassen verschiedener AQP4-Isoformen.



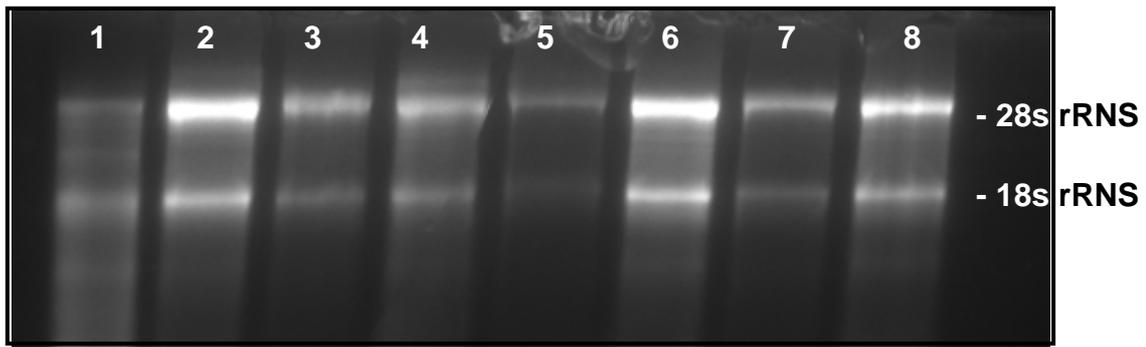
**Abb. 21: AQP4-Protein-Expression nach PKC-Protokoll Aufschluss**

Alle Protokolle liefen unter gleichen Inkubationsbedingungen. Pro Aliquot wurden  $3 \times 10^6$  Zellen verwendet. Nach Aktivierung der Kardiomyozyten mit dem Phorbol ester PMA war in beiden Ventrikeln die AQP4-Protein Expression signifikant erhöht.

### 3.7 Reinheitsanalyse der Gesamt-RNS

Die posttranskriptionelle Reinheit der RNS ist abhängig von der Kontamination (Urlaub et al., 1989), der Stabilität (Baki and Alexis, 1994; Ross, 1995) und dem Degradierungs-

grad (Bernstein and Ross, 1989). Die RNS-Präparation lieferte im Mittel 0,5 µg – 2 µg (Abb. 22). Gehalt und Reinheit der RNS-Proben nach Gewinnung mit TRIzol® unterschieden sich von der Reinheit der mit dem Qiagen RNeasy-Kit aufgereinigten Myokardproben. Der Gehalt war beim Qiagen RNeasy-Kit im Mittel um 60 % geringer, weshalb alle weiteren RNS-Proben-Aufschlüsse lediglich mit TRIzol® durchgeführt wurden.



**Abb. 22: RNS Reinheitskontrolle nach gelelektrophoretischer Auftrennung**

2 %iges Formalin-Agarosegel, bei 40 mA. Die hochreine RNS ist frei von DNS-Kontaminationen und Abbauprozessen. Die für Eukaryonten typischen RNS-Banden für die 28- und 18s rRNS sind deutlich erkennbar. Probe 1 – 4: verschiedene Kaninchen-Myokardproben; Proben 5 – 8: verschiedene humane Myokardproben

### 3.8 Primer-gerichtete-Fragmentierung der cDNS

Die verwendeten Primer (Tab. 3) kodierten alle ausschließlich für AQP4-Isoformen (ausgenommen  $\beta$ -Aktin und GAPDH) bei verschiedenen Spezies und Gewebetypen.

Nicht alle Daten zur spezifischen Primer-Amplifikation an der cDNS (2.13.8) konnten der Literatur entnommen werden. Die Annealing-Temperaturen ( $T_M$ ) waren z.T. nicht in der Literatur angegeben und mussten entweder berechnet und experimentell bestimmt werden. Die optimale Zyklenzahl und die Annealing-Temperatur für alle spezifischen Primer-Paare wurden für das Kaninchenmyokard optimiert. Die Wahl der Primer ließ eine Unterscheidung der AQP4-Isoformen zu. Die Primer waren Exon-überspannend. Ihre Sequenzen sind in Tabelle 3 in 5`-3`-Orientierung dargestellt. Die zur PCR benötigten Primer wurden von der Firma EUROGENTEC (Mainz) bezogen.

Ergebnisse

Tab. 3: PCR- Primer

5'- AGA GAT GGC CAC GGC TGC TT - 3' sense 5'- ATT TGC GGT GGA CGA TGG AG - 3' antisense (Gassen H.G. and Schrimpf G., 1999)						
Primer: human $\beta$ -Aktin		$T_M$ 62°C				
	Laufende Nr.	Temperatur	Zeit	Schleife zu	Zyklen	Dauer
Start	1	94	10 min	-	-	2,5 h
Denaturierung	2	94	1 min	-	-	-
Annealing	3	62	1 min	-	-	-
Elongation	4	72	1 min	2	33	-
Abbruch	5	72	10 min	-	-	-
Pause	6	4	-	-	-	-

5'- TGA AGG TCG GAG TGA ACG GA -3' sense 5'- GAT GAC CTT GGC CAG GGG GG - 3' antisense (Nakahama et al., 2002)						
Primer: rabbit GAPDH		$T_M$ 65°C				
	Laufende Nr.	Temperatur	Zeit	Schleife zu	Zyklen	Dauer
Start	1	94	5 min			1,5 h
Denaturierung	2	94	30 s			-
Annealing	3	65	30 s			-
Elongation	4	72	1 min	2	25	-
Abbruch	5	72	10 min			-
Pause	6	4	-			-

5'-TTT CCT TTC TAG GGA CAG TTT GGA - 3' sense 5'- GAT GTT CTC TCT GGT ACA CAA AGG -3' antisense (Umenishi and Verkman, 1998)						
Primer: hB1/C1		$T_M$ 60°C				
	Laufende Nr.	Temperatur	Zeit	Schleife zu	Zyklen	Dauer
Start	1	94	5 min	-	-	2 h
Denaturierung	2	94	30 s	-	-	-
Annealing	3	60	30 s	-	-	-
Elongation	4	72	1,5 min	2	33	-
Abbruch	5	72	10 min	-	-	-
Pause	6	4	-	-	-	-

## Ergebnisse

<b>Primer: hMIWC</b>		<b>T<sub>M</sub> 68°C</b>		5'- GAA GAT CTA TGG TGG CTT TCA AAG GGG T- 3' sense 5'- CCA TGG TGA CTC CCA GGC CTC CCA – 3' antisense (Yang et al., 1995)		
				<b>Laufende Nr.</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
<b>Start</b>	1	94	5 min	-	-	2 h
<b>Denaturierung</b>	2	94	30 s	-	-	-
<b>Annealing</b>	3	<b>68</b>	30 s	-	-	-
<b>Elongation</b>	4	72	1,5 min	2	33	-
<b>Abbruch</b>	5	72	10 min	-	-	-
<b>Pause</b>	6	4	-	-	-	-

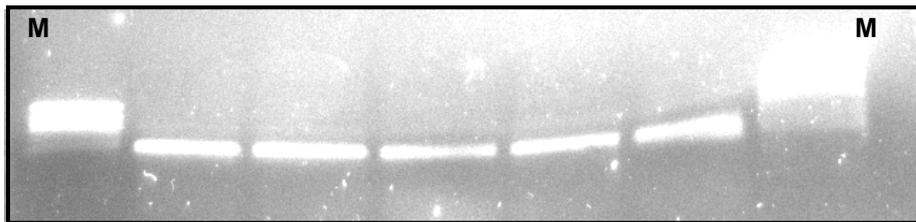
<b>Primer: h A1/C1</b>		<b>T<sub>M</sub> 62°C</b>		5'- CCC CTA ACA CTC CAA AAA CCC AAT-3' sense 5'- GAT GTT CTC TCT GGT ACA CAA AGG- 3' antisense (Umenishi and Verkman, 1998)		
				<b>Laufende Nr.</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
<b>Start</b>	1	94	5 min	-	-	2 h
<b>Denaturierung</b>	2	94	30 s	-	-	-
<b>Annealing</b>	3	<b>62</b>	30 s	-	-	-
<b>Elongation</b>	4	72	1,5 min	2	33	-
<b>Abbruch</b>	5	72	10 min	-	-	-
<b>Pause</b>	6	4	-	-	-	-

<b>Primer: h A1/A2</b>		<b>T<sub>M</sub> 65°C</b>		5'- CCC-CTA-ACA-CTC-CAA-AAA-CCC-AAT-3' sense 5'- TCA TGC CTT CCC CAG CCA GA-3' antisense (Umenishi and Verkman, 1998)		
				<b>Laufende Nr.</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
<b>Start</b>	1	94	5 min	-	-	2h
<b>Denaturierung</b>	2	94	30 s	-	-	-
<b>Annealing</b>	3	<b>65</b>	30 s	-	-	-
<b>Elongation</b>	4	72	1,5 min	2	33	-
<b>Abbruch</b>	5	72	10 min	-	-	-
<b>Pause</b>	6	4	-	-	-	-

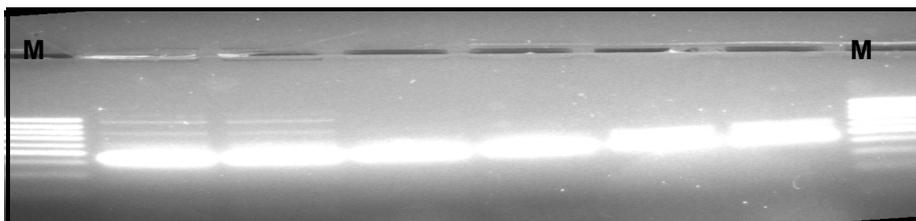
### 3.9 Fragmentgrößen

Mit den in Tabelle 3 aufgelisteten humanen- und Maus-Primern wurde untersucht, ob das Kaninchen-Myokard unter physiologischen Bedingungen AQP4-Isoformen exprimiert. Grundlage waren die verschiedenen für AQP4 in unterschiedlichen Spezies und Gewebetypen für Exon-Promoter-Regionen kodierenden Primer. Die ausgewählten Primer lagen alle innerhalb der jeweiligen zu untersuchenden Sequenz für AQP4.

Die PCR erfolgte mit Primern, die spezifisch für cDNAs-ausgewählte Marker-Gene sind. Solange die Zyklenzahl der PCR-Reaktion nicht im Sättigungsbereich lag, war die Bandenstärke des PCR-Produkts direkt proportional zu dem Anteil der entsprechenden mRNS an der Gesamt-RNS. Um zu gewährleisten, dass in allen Ansätzen gleich viel RNS eingesetzt wurde, wurde ein ubiquitär exprimiertes Gen amplifiziert. Unter dieser Bedingung mussten bei allen Ansätzen Banden gleicher Stärke resultieren. Für Kaninchen wurde GAPDH (Abb. 23 oben) und für humanes Gewebe  $\beta$ -Aktin (Abb. 23 unten) als „housekeeping“-Gen verwendet.



GAPDH Kaninchen Proben bei 481 bp 65 °C und 25 Zyklen (s. Tabelle 3)



$\beta$ -Aktin humaner Proben bei 353 bp  $T_M$  62 °C und 33 Zyklen (s. Tabelle 3)

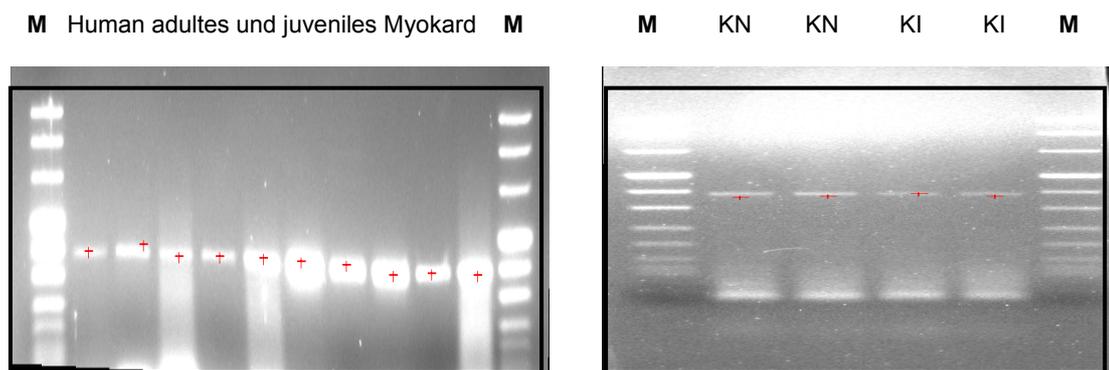
**Abb. 23: Housekeeping-Gene bei Kaninchen- (GAPDH) und humanem ( $\beta$ -Aktin) Myokard**  
 2 %iges Agarosegel 50 V; **M:** Marker Roche Fermentas SM 383  
 Repräsentative Proben für alle weiteren Agarose-Gele als Kontrollgel.

Nachdem zur reproduzierbaren Ausbildung eines Fragmentes alle PCR-Bedingungen etabliert waren, wurden die amplifizierten Fragmentgrößen mit Angaben aus der Literatur

verglichen. Damit ergaben sich erstmals Fragmentgrößen für AQP4-Isoformen für Kardiomyozyten von Kaninchen (Abb. 24, 25 und 26).

Um sicher zu stellen, dass in allen Proben-Ansätzen cDNS synthetisiert wurde, wurden die beiden ubiquitär exprimierten Gene GAPDH und  $\beta$ -Aktin (Abb. 23) amplifiziert. Die Gele in Abb. 23 dienen als Kontrolle für alle weiteren Primer. Die ermittelten Fragmentgrößen sind mit den Daten in der Literatur identisch

Die Primer-Amplifizierung für die jeweilige AQP4-Isoform zeigten - nach Etablierung von Standardbedingungen für die PCR - unterschiedliche Isoformen. Im weiteren Verlauf werden die einzelnen PCR-Fragmente, welche für die AQP4-Isoformen codieren, für das Kaninchen dargestellt (Abb. 24 Gel re.; 25 Gel li.; 26 Gel li. und re.) Die verwendeten Primer (Tab. 3) wurden für humanes, nicht kardiales Gewebe bereits publiziert. Daher wurden insbesondere Primer-Amplifikationen für Kaninchen untersucht.



**Abb. 24: Auswahl einiger PCR-Proben zur hMIWC-Fragment-Detektion**

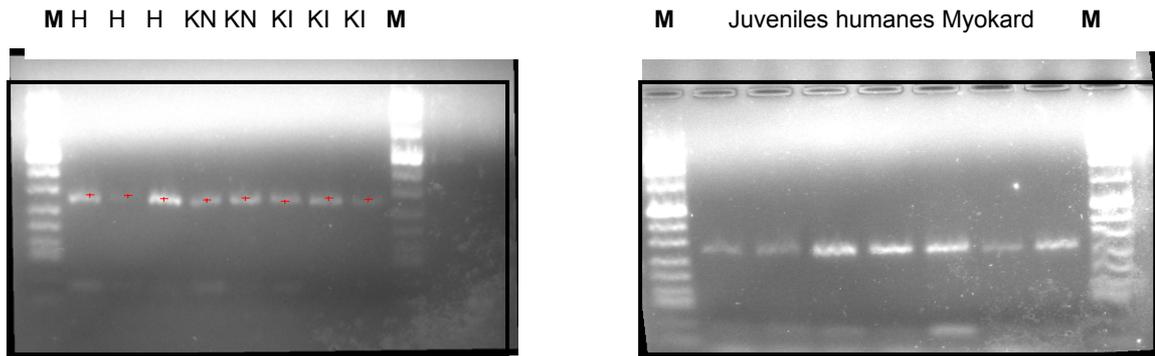
**(Gel links):** Einige adulte und juvenile humane Myokardproben mit hMIWC-Primern nach Tab. 3.

**(Gel rechts):** Normoxisches (**KN**) & ischämisches (**KI**) Kaninchen. Myokard mit hMIWC-Primern.

Die KN- und KI-Proben zeigten eine homologe Bandenstärke; 2 %iges Agarosegel;

**M:** Marker Roche VIII-ladder.

Ermittlung der hMIWC-Isoform für humane und Kaninchen-Kardiomyozyten durch Primer.

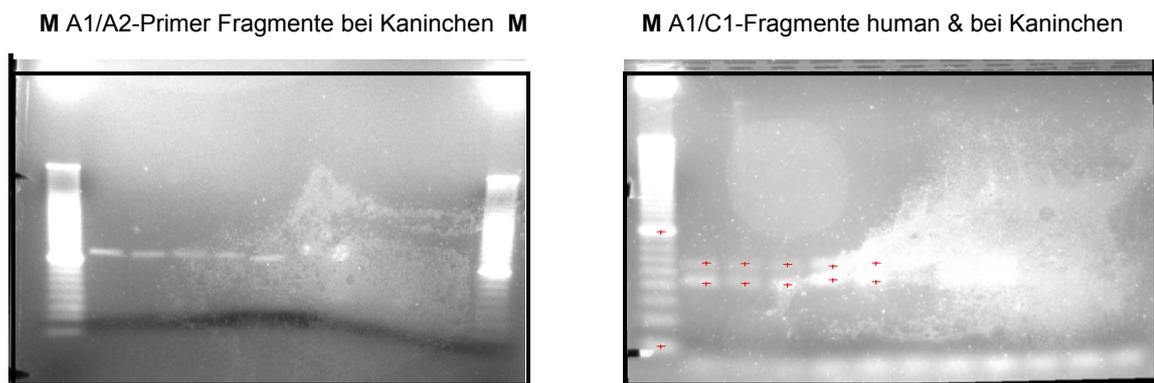


**Abb. 25: Auswahl einiger PCR-Proben zur B1/C1-Fragment-Detektion**

**(Gel links):** Adulte humane Myokardproben (**H**) und Kaninchen normoxisch (**KN**) sowie Kaninchen ischämisch (**KI**) mit B1/C1-Primern (nach Tab. 3).

**(Gel rechts):** juvenile humane Myokardproben mit B1/C1-Primern (nach Tab. 3); 2 %iges Agarosegel; **M:** Marker Roche VIII-ladder.

Die B1/C1-Isoform wurde für humane und Kaninchen-Kardiomyozyten durch Primer ermittelt.



**Abb. 26: Repräsentative PCR-Proben zur A1/A2- und A1/C1-Fragment-Detektion**

**(Gel links):** Kaninchen Myokardproben normoxisch (Spur 1 - 2) und Kaninchen ischämisch (Spur 3 - 5) mit A1/A2-Primern (nach Tab. 3).

Die A1/B1-Isoform konnte im Kaninchen durch Primer ermittelt werden.

**(Gel rechts):** Juvenile humane Myokardproben auf A1/C1-Primer-Fragment Spur 1 - 5 und normoxisches Kaninchen Myokard Spur 6 - 10

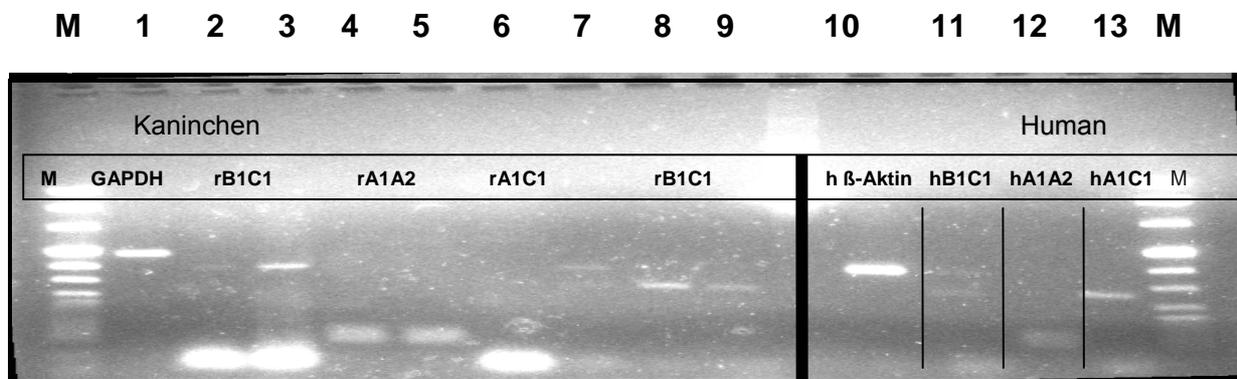
Deutlich sind bei der humanen A1/C1-Amplifikation Mehrfach-Amplifikationen sichtbar.

Die Isoform A1/C1 wurde beim Kaninchen nicht detektiert.

4 %iges Agarosegel; **M:** Marker Track-It Invitrogen 10 bp-ladder

**Tab. 4: Dokumentierte und ermittelte Fragment-Größen**

Primer	Fragmentgrößen für humanes Myokard aus der Literatur	Ermittelte Fragmentgrößen Kaninchen-Myokard
hMIWC	320 bp	390 bp
B1 / C1	289 bp	290 bp
A1 / C1	173 bp	134 bp & 164 bp
A1 / A2	111 bp	110 bp

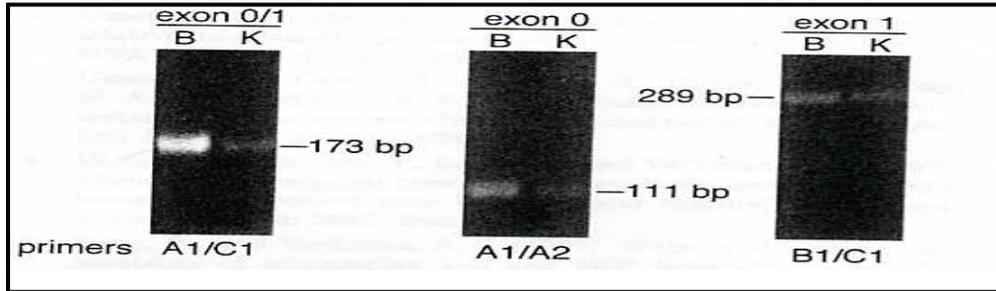


**Abb. 27: Übersicht amplifizierter humaner und Kaninchen-PCR-Fragmente**

Das Kürzel (**r**) steht für rabbit (Kaninchen); (**h**) steht für human.

- |                               |                              |
|-------------------------------|------------------------------|
| M: Marker Roche VIII 2 µg     | 8 r Normoxisch B1/C1 4 µg    |
| 1: Kontroll GAPDH Kanin. 2 µg | 9 r Ischämisch B1/C1 2 µg    |
| 2 r Normoxisch hB1/C1 2 µg    | 10 h (00.150) h β-Aktin 2 µg |
| 3 r Ischämisch hB1/C1 4 µg    | 11 h (00.278) B1/C1 2 µg     |
| 4 r Normoxisch A1/A2 2 µg     | 12 h (y 114) A1/A2 2 µg      |
| 5 r Ischämisch A1/A2 2 µg     | 13 h (H.K.LV) A1/C1 2 µg     |
| 6 r Normoxisch A1/C1 2 µg     | M: Marker Roche VIII 2 µg    |
| 7 r Ischämisch A1/C1 2 µg     |                              |

Die Amplifikationen der ischämischen Proben waren im Hinblick auf die AQP4-Isoformen – entsprechend den vorangegangenen Versuchsreihen (Abb. 13 und 14) – den normoxischen Amplifikationen ähnlich. Zwischen den humanen und den Kaninchen-Proben bestanden im Verhältnis zur Auftragung deutliche Unterschiede innerhalb der Expressionsstärke. Solche Unterschiede wurden bereits innerhalb einer Spezies an unterschiedlichen Organen beschrieben (Umenishi 1998; Abb. 28).



**Abb. 28: Isoformen-Amplifikationen (Umenishi 1998) in humanem Gewebe**

Einzelne Primer-Spleißvarianten an isoliertem humanen Hirn (**B**) und Nieren (**K**). Im Gehirn sind die Spleißvarianten aller drei AQP4-Isoformen deutlich stärker exprimiert.

**hB1/C1 für kurzes mRNS Transkript** nach Umenishi Genomics 1998 auf Exon1, Resultat 289 bp

sense (+60 bis +83 des Exon1)

antisense (+328 bis +325 des Exon4)

**hA1/ A2 für langes mRNS Transkript** nach Umenishi Genomics 1998 auf Exon0, Resultat 111bp

sense (+49 bis +72 des Exon0)

antisense (+159 bis +140 des Exon0)

**hA1/C1 für langes mRNS Transkript** nach Umenishi Genomics 1998 auf Exon0-4, Resultat 173bp

sense (+49 bis +72 des Exon0)

antisense (+328 bis +325 des Exon4)

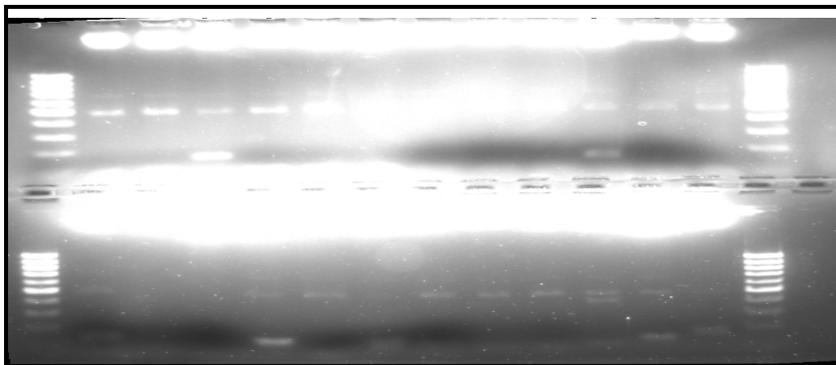
Beim Kaninchen-Myokard existieren bezüglich der Amplifikationsstärke der Isoformen, Unterschiede zwischen den normoxischen Myokard-Proben und denen nach pharmakologischer Ischämie (Abb. 27). Nach der Spezies-bedingten Amplifikation der einzelnen Isoformen ergaben sich unterschiedliche Expressionen der Primer-detektierten AQP4-Isoformen zwischen humanem und Kaninchen-Myokard. Während beim humanen Myokard, die für das Exon0/1 codierenden A1/C1-Primer im Gehirn sehr stark exprimiert sind (Abb. 28), war beim Kaninchen die den Primern zugeordnete AQP4-Isoform A1/C1 nur schwach exprimiert (Abb. 27).

Des Weiteren waren beim Kaninchen die für das humane Exon1 codierenden B1/C1-Primer (Abb. 27) deutlich stärker exprimiert als beim Menschen im Gehirn und in der Niere (Abb. 28). Die für das humane Exon0 codierenden A1/A2-Primer wurden im Kaninchen-Myokard etwas stärker exprimiert als bei humanem Myokard (Abb. 27).

Am Kaninchen-Myokard wurden die Existenz von drei Isoformen des AQP4-Proteins ermittelt, welche als Spleißvarianten des AQP4-Moleküls gelten (Yang et al., 1995; Umenishi and Verkman, 1998). Durch die differenzierte Expressions-Regulation der mRNS-AQP4-Spleißvarianten im Kaninchen-Myokard ist der Aufbau der AQP4-Proteine in einem komplexeren Muster zu betrachten. Die Spleißvarianten der AQP4-Isoformen sind in Abhängigkeit vom Gewebetyp unterschiedlich stark exprimiert.

### 3.10 Klonierung der AQP4-Fragmente

Die Klonierung der PCR-Produkte erfolgte in einem pcR<sup>®</sup> 2.1-Vektor (Invitrogen, Eggenstein). Von den insgesamt 274 potenziellen positiven Kolonien wurden 22 Klone nach Restriktion mit dem Restriktionsenzym Eco R1 (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben identifiziert und sequenziert (Abb. 29).



**Abb. 29: Restriktionsanalyse identifizierter Klone**

*Die Plasmid-DNS wurde einem Eco R1-Verdau unterzogen und auf einem 1 %igen Agarosegel analysiert. Nicht in allen Spuren ist das durch die Klonierung entstandene Fragment zu sehen (Slot 3 /10 /17/25 & 26). Nur die positiven Klone wurden zur Sequenzanalyse weiterverwendet.*

### 3.11 Sequenzanalyse

Für alle dargestellten Sequenzanalysen wurde die Datenbank „All GenBank +EMBL +DDBJ +PDB Sequenzen“ (ohne EST, STS, GSS, umweltbedingte Proben oder gegen-

wärtige 0,1- oder 2-HTGS-Sequenzen) verwendet. Für alle Online-Referenzen wurden die für die Spezies angegebenen identischen Sequenz-Identifikationen (S&S-Ident.) bewusst in den für die Auswertung benötigten Original-Kürzeln belassen. Dies trifft auch für die prozentuale Sequenzhomologie bekannter Datenbanken zu.

**hMIWC.** Ein Probenfragment steht stellvertretend für alle weiteren mit hMIWC-Primern ermittelten Sequenzen. Dabei handelte es sich um ein inseriertes, mit hMIWC-Primern amplifiziertes Fragment einer normoxischen DNS-Kaninchenprobe. Das detektierte und sequenzierte Transkript umspannt 513 bp und wurde mit einem T7-Primer sequenziert. Nach Ermittlung der Schnittstellen ergab die Sequenzanalyse eine für die Primergerichtete Identifizierung der Sequenz von Base 65 bis 375 (310 bp) des Transkripts.

Innerhalb der Sequenz ergaben sich vier für Methionin codierende Kodons, eine TATA Box aber keine Kozak-Sequenz. Es wurde keine für Wasserkanäle spezifisch codierende NPA-Sequenz (-AACCCCGCC-) detektiert.

#### *Basensequenz des hMIWC-Fragments*

```
TAATTTTCCGTGAAACTGGATGATCTTTGAA[TATTAAATG]AAAGGAGACTAGAATAAC
AGTCTCTTGACTATTC[ATG]AAGGAGCTTTAGCNGAAGCATTCTTTCTTGGTGTGCAN
ATCACSCCTGGCAGCCCCTGCCCANAGTACCCGAAG[ATG]GCAGGCCTTGTTCCCTT
CACCTAAATTCATAAACCTGGGTGTAGTGGCTTCTG[ATG]CTGATTTGTTTCTCTTTTC
AGTAAGTGTGGACCTTTGTGTACCAGAGAGAACATCAAGCCGAATTCCNNCNCNACT
GGCGGCCGTTACTA
```

Für den Kaninchen-Transformanden, der auf das Fragment hMIWC mit definiertem Primer gerichtet war, galt: Für den Quecksilber-insensitiven-Wasserkanal (MIWC/AQP4) von Kaninchen bestand eine 98 - 100 %ige Sequenz-Homologie zum humanen AQP4-Gen. Innerhalb der Sequenz befand sich neben mehreren Methionin-Startsequenzen auch eine TATA-Box. Des Weiteren wurden Promoter-Startsequenzen detektiert. Eine deutlich amplifizierte Sequenzhomologie des Kaninchens-Myokards bezog sich auf den Lokalisationsort des AQP4-Gens. Es bestand eine 98 %ige Homologie zum humanen Chromosom 18.

---

Online-Referenzen und \_\_\_\_\_S&S-Ident.

[gi|18875246|gb|AC018371.10|](#) Homo sapiens chromosome 18, clone RP11-552O4, complete sequence Length = 170123 Score = 533 bits (268), Expect = e-148 Identities = 275/279 (98 %) Strand = Plus / Plus

[gi|7528027|gb|AC010854.3|AC010854](#) Homo sapiens chromosome 18, clone RP11-349N23, complete sequence Length = 169682 Score = 533 bits (268), Expect = e-148 Identities = 275/279 (98 %) Strand = Plus / Minus

[gi|10503924|gb|U63613.1|U63611S3](#) Homo sapiens aquaporin-4 (AQP4) gene, exons0; and 1 and partial cds Length = 661

[gi|1072052|gb|U34845.1|HSU34845](#) Human mercurial-insensitive water channel mRNA, form 1, complete cds Length = 1665

[gi|1373045|gb|U34844.1|HSU34844](#) Human mercurial-insensitive water-channel gene, 5' region and partial exon1, Length = 870 Score = 447 bits (225), Expect = e-123 Identities = 270/280 (96 %), Gaps = 5/280 (1 %) Strand = Plus / Plus

[gi|50659062|ref|NM\\_004028.3|](#) Homo sapiens aquaporin 4 (AQP4), transcript variant b, mRNA Length = 5136 Score = 91.9 bits (46), Expect = 7e-16 Identities = 46/46 (100 %) Strand = Plus / Plus

[gi|3329363|gb|AF026815.1|HSAQPF2](#) Homo sapiens aquaporin-4 (AQP4) gene, promoter region and exon1, partial sequence Length = 409 Score = 91.9 bits (46), Expect = 7e-16 Identities = 46/46 (100 %) Strand = Plus / Plus

[gi|50659061|ref|NM\\_001650.4|](#) Homo sapiens aquaporin 4 (AQP4), transcript variant a, mRNA Length = 5216 Score = 64.1 bits (32), Expect = 2e-07 Identities = 32/32 (100 %) Strand = Plus / Plus

**B1 / C1.** Ein Probenfragment steht stellvertretend für alle weiteren mit B1/C1-Primern ermittelten Sequenzen. Dabei handelte es sich um ein inseriertes, mit B1/C1-Primern amplifiziertes Fragment einer DNS-Probe von normoxischem Kaninchen-Myokard. Das detektierte und sequenzierte Transkript umspannt 644 bp und wurde mit einem T7-

Primer nach Herstellerangaben sequenziert. Nach Ermittlung der Schnittstellen ergab die Sequenzanalyse eine für die Primer gerichtete Identifizierung der Sequenz von Base 102 bis 418 (316bp) des Transkripts.

Innerhalb der Sequenz ergaben sich vier für Methionin-codierende Kodons jedoch keine TATA Box, keine Kozak-Sequenz und keine für Wasserkanäle spezifisch codierende NPA-Sequenz (-AACCCCGCC-).

*Basensequenz des B1/C1-Fragments*

```
ATGTTCTCTCTGGTACACAAAGGTCCACACTTACTGAAAAGAGAAACAAATCAGCAT
CAGAAGCCACTACACCCAGGTTTATGAATTTAGGTGAGGGGAACAAGGCCTGCCAT
CTCCGGGTACTGTGGGCAGGGGCTGCCAGGCGTGATTTGCACACCAAGAAAGAAT
GCTTCTGCTAAAGCTCCTTCATGAATAGTCAAGAGACTGTTATTCTAGTCTCCTTTCA
TTTAATATTCAAAGATCATCCAGTTTCACGGAAAATTATCCAAACTGTCCCTAGAAAG
GAAAAGCCGAATTCCAGCACACT
```

Für den Kaninchen-Transformanden, der auf das PCR-Fragment B1/C1 mit definiertem Primer gerichtet war, galt: Für den Quecksilber-insensitiven-Wasserkanal (MIWC/AQP4) von Kaninchen bestand eine 99 - 100 %ige Sequenzhomologie zum humanen AQP4-Gen. Innerhalb der Sequenz befanden sich vier Methionin-Startsequenzen. Des Weiteren wurden für das Kaninchen Promoter-Startsequenzen detektiert, die ebenfalls auf das humane AQP4-Gen am Exon0 und Exon1 gerichtet sind und deckungsgleich mit der zu erwarteten Primerkonfiguration waren. Eine deutlich amplifizierte Sequenzhomologie des Kaninchens bezieht sich auf den Lokalisationsort des AQP4-Gens. Es bestand eine 99 -%ige Homologie zum humanen Chromosom 18.

Online-Referenzen und S&S-Ident .

[gi|18875246|gb|AC018371.10|](#) Homo sapiens chromosome 18, clone RP11-552O4, complete sequence Length = 170123 Score = 557 bits (281), Expect = e-156  
Identities = 287/289 (99 %) Strand = Plus / Minus

[gi|7528027|gb|AC010854.3|AC010854](#) Homo sapiens chromosome 18, clone RP11-349N23, complete sequence Length = 169682 Score = 557 bits (281), Expect = e-156  
Identities = 287/289 (99 %) Strand = Plus / Plus

[gi|15887246|gb|AC008639.8|](#) Homo sapiens chromosome 5 clone CTB-179J16, complete sequence Length = 108337 Score = 557 bits (281), Expect = e-156 Identities = 287/289 (99 %) Strand = Plus / Plus

[gi|10503924|gb|U63613.1|U63611S3](#) Homo sapiens aquaporin-4 (AQP4) gene, exons0; and 1 and partial cds Length = 661 Score = 557 bits (281), Expect = e-156 Identities = 287/289 (99 %) Strand = Plus / Minus

[gi|1072052|gb|U34845.1|HSU34845](#) Human mercurial-insensitive water channel mRNA, form 1, complete cds Length = 1665 Score = 478 bits (241), Expect = e-132 Identities = 278/285 (97 %), Gaps = 4/285 (1 %) Strand = Plus / Minus

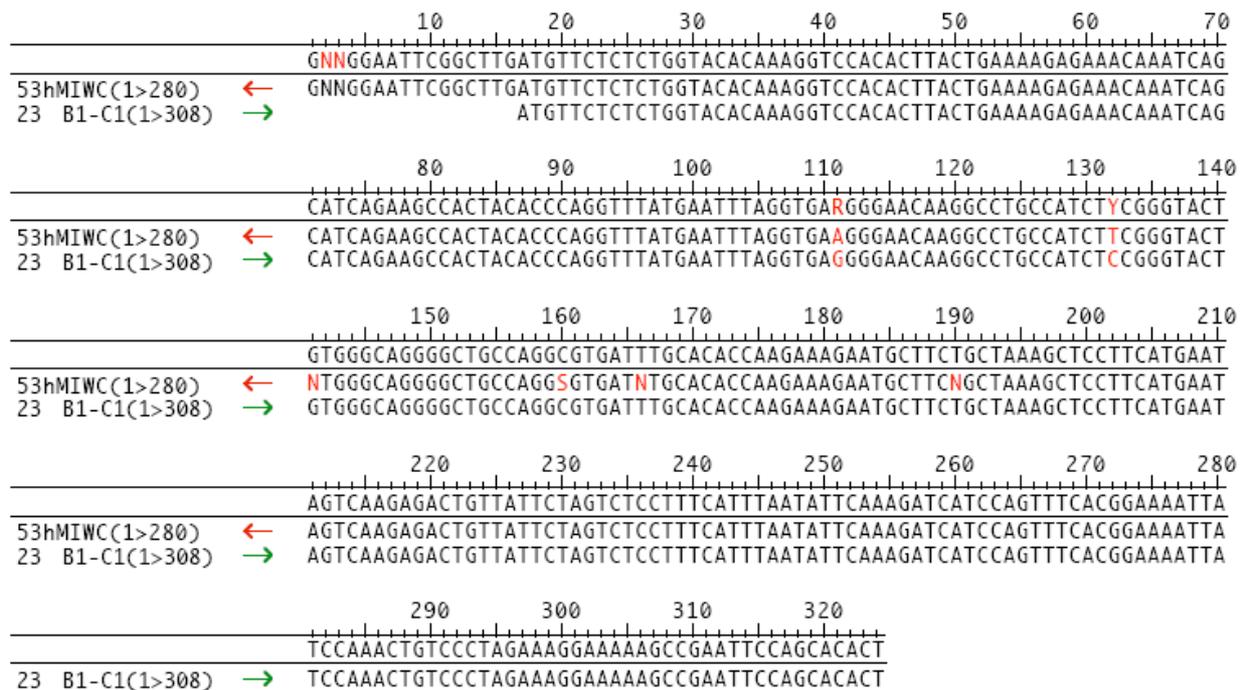
[gi|1373045|gb|U34844.1|HSU34844](#) Human mercurial-insensitive water-channel gene, 5' region and partial exon1, Length = 870 Score = 472 bits (238), Expect = e-130 Identities = 282/290 (97 %), Gaps = 5/290 (1 %) Strand = Plus / Minus

[gi|3329363|gb|AF026815.1|HSAQPF2](#) Homo sapiens aquaporin-4 (AQP4) gene, promoter region and exon1, partial sequence Length = 409 Score = 109 bits (55), Expect = 4e-21 Identities = 55/55 (100 %) Strand = Plus / Minus

[gi|50659062|ref|NM\\_004028.3|](#) Homo sapiens aquaporin 4 (AQP4), transcript variant mRNA Length = 5136 Score = 93.7 bits (47), Expect = 3e-16 Identities = 47/47 (100 %) Strand = Plus / Minus

Nach der Alignment-Analyse waren die hMIWC- und B1/C1-Primer-gerichteten Sequenzen in einer Länge von 268 Basenpaaren komplementär zueinander. Das „Overlay“ beider Sequenzen wurde mit dem Programm „DNA-STAR“ des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf ermittelt.

Sequenz-, „Overlay“



**A1 / A2.** Auch hier steht ein Probenfragment stellvertretend für alle weiteren mit A1/A2-Primer ermittelten Sequenzen. Dabei handelte es sich um ein inseriertes, mit A1/A2-Primern amplifiziertes Fragment einer DNS-Probe von normoxischem Kaninchen-Myokard. Das detektierte und sequenzierte Transkript umspannte 513 bp und wurde mit einem T7-Primer nach Herstellerangaben sequenziert. Nach Ermittlung der Schnittstellen ergab die Sequenzanalyse eine für die Primer gerichtete Identifizierung der Sequenz von Base 93 bis 253 (160 bp) des Transkripts.

Die Sequenz enthielt ein für Methionin-codierendes Kodon, keine TATA Box, keine Kozak-Sequenz und keine für Wasserkanäle spezifisch codierende NPA-Sequenz (-AACCCCGCC-).

*Basensequenz des A1/A2-Fragments*

ATACTGAGGTCCCTGGCATC**ATG**CCTTCCCCAGCCAGAGTGCAGCTCTCATTGCCT  
 GCCCTGCAGCTCCCTGTGTGCTGGGAGTCAGATTACGGCCACTTGTCTGATTGGGT  
 TTTTGGAGTGTTAGGGGAAGCCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTT

Für den Kaninchen-Transformanden, der auf das PCR-Fragment A1/A2 mit definiertem Primer gerichtet war, galt: Für den Quecksilber-insensitiven Wasserkanal (MIWC/AQP4)

von Kaninchen bestand eine 99 %ige Sequenzhomologie zum humanen AQP4-Gen. Innerhalb der Sequenz befand sich eine Methionin-Startsequenz. Des Weiteren wurden für das Kaninchen eine Promoter-Startsequenz im Exon0 detektiert, die eine Homologie zum humanen AQP4-Gen besaß. Eine deutlich amplifizierte Sequenzhomologie des Kaninchens bezog sich auf den Lokalisationsort des AQP4-Gens. Es bestand eine 99 %ige Homologie zum humanen Chromosom 18. Des Weiteren fand sich eine Homologie zum Maus-AQP4-Genom mit mehreren partiellen Exon-Sequenzen und eine Homologie zur M1-AQP4-mRNS-Isoform der Maus.

Online-Referenzen und \_\_\_\_\_S&S-Ident .

[gi|18875246|gb|AC018371.10|](#) Homo sapiens chromosome 18, clone RP11-552O4, complete sequence Length = 170123 Score = 212 bits (107), Expect = 2e-52 Identities = 110/111 (99 %) Strand = Plus / Minus

[gi|7528027|gb|AC010854.3|AC010854](#) Homo sapiens chromosome 18, clone RP11-349N23, complete sequence Length = 169682 Score = 212 bits (107), Expect = 2e-52 Identities = 110/111 (99 %) Strand = Plus / Plus

[gi|3329362|gb|AF026814.1|HSAQPF1](#) Homo sapiens aquaporin-4 (AQP4) gene, promoter region and exon0, partial sequence Length = 2092 Score = 212 bits (107), Expect = 2e-52 Identities = 110/111 (99 %) Strand = Plus / Minus

[gi|10503922|gb|U63611.1|U63611S1](#) Homo sapiens aquaporin-4 (AQP4) gene, exon0, Length = 339 Score = 204 bits (103), Expect = 5e-50 Identities = 106/107 (99 %) Strand = Plus / Minus

[gi|50659061|ref|NM\\_001650.4|](#) Homo sapiens aquaporin 4 (AQP4), transcript variant a, mRNA Length = 5216 Score = 125 bits (63), Expect = 3e-26 Identities = 66/67 (98 %) Strand = Plus / Minus

[gi|1680707|gb|U63622.1|HSU63622](#) Human aquaporin 4 (AQP4) mRNA, complete cds Length = 1152 Score = 83.8 bits (42), Expect = 1e-13 Identities = 42/42 (100 %) Strand = Plus / Minus

[gi|32454756|gb|AF219992.2](#) Mus musculus aquaporin-4 (AQP4) gene, exonsA, B, 0, X, 1 and 2 and partial cds, alternatively spliced Length = 13014 Score = 79.8 bits (40), Expect = 2e-12 Identities = 43/44 (97 %) Strand = Plus / Minus  
Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.39 Identities = 27/29 (93 %) Strand = Plus / Minus

[gi|18481726|gb|AF469168.1](#) Mus musculus aquaporin-4 M1 isoform (AQP4) mRNA, complete cds Length = 1106 Score = 79.8 bits (40), Expect = 2e-12 Identities = 43/44 (97 %) Strand = Plus / Minus  
Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.39 Identities = 27/29 (93 %) Strand = Plus / Minus

Die Sequenz der A1 / A2-Primer lag auf dem humanen Genom weit entfernt von den beiden anderen Sequenzbereichen von hMIWC und B1/C1; deshalb ergab sich auch kein „Overlay“. Für diese Ergebnisse wurde das „BLAST-Genome“ Programm des NCBI verwendet. Die Ergebnisse wurden in dieser Arbeit als Online-Referenz mit Spezies- und Sequenz-Identifikation angegeben.

**A1 / C1.** Ein Probenfragment steht stellvertretend für alle weiteren mit dem A1/C1-Primer ermittelten Sequenzen. Es handelte sich um ein inseriertes, mit A1/C1-Primern amplifiziertes Fragment einer DNS-Probe von normoxischem Kaninchenmyokard. Das detektierte und sequenzierte Transkript umspannt 566 bp und wurde ebenfalls mit einem T7-Primer nach Herstellerangaben sequenziert. Nach Ermittlung der Schnittstellen ergab die Sequenzanalyse eine für die Primer gerichtete Identifizierung der Sequenz von Base 91 bis 280 (189 bp) des Transkripts.

Für den Kaninchen-Transformanden, der auf das PCR-Fragment A1/C1 mit definiertem Primer gerichtet war, gab es kein auf die AQP4-Sequenz verwendbares Ergebnis. Es bestand vielmehr eine Sequenzhomologie zum humanen Mitochondrien-Genom. Abbildung 27 zeigt bei der A1/C1-Fragment-PCR im Kaninchenmyokard eine verminderte Expression der mRNS-Spleißvariante im Vergleich zu den anderen gerichteten Primern.

Online-Referenzen und S&S-Ident.

[gi|32348142|gb|AY289062.1](#) Homo sapiens isolate B6 mitochondrion, complete genome Length = 16570 Score = 210 bits (106), Expect = 8e-52  
Identities = 109/110 (99 %) Strand = Plus / Minus

[gi|33466037|gb|AY275537.1](#) Homo sapiens isolate 183 mitochondrion, complete genome Length = 16568 Score = 202 bits (102), Expect = 2e-49  
Identities = 108/110 (98 %) Strand = Plus / Minus

[gi|33466023|gb|AY275536.1](#) Homo sapiens isolate 167 mitochondrion, complete genome Length = 16567 Score = 202 bits (102), Expect = 2e-49  
Identities = 108/110 (98 %) Strand = Plus / Minus

[gi|33466009|gb|AY275535.1](#) Homo sapiens isolate 2032 mitochondrion, complete genome Length = 16571 Score = 202 bits (102), Expect = 2e-49  
Identities = 108/110 (98 %) Strand = Plus / Minus

### 3.14 Northern Blots (Hybridisierung)

Die auf ein 1 %iges denaturierendes Formaldehyd-Gel aufgetragenen Myokard-RNS-Proben von Kaninchen und Menschen lieferten nach dem Blotten und nach dem Hybridisieren mit einer spezifischen RNS-Sonde folgende Ergebnisse:

Das für das AQP4-Wasserkanal-Protein kodierende Kaninchen-RNS-Molekül war 5,5 kb groß. Es lag damit nahe an der humanen RNS-Molekülgröße von 6 kb. Literaturangaben zu der Kaninchen-RNS-Molekül-Größe lagen bisher nicht vor (Abb. 30).

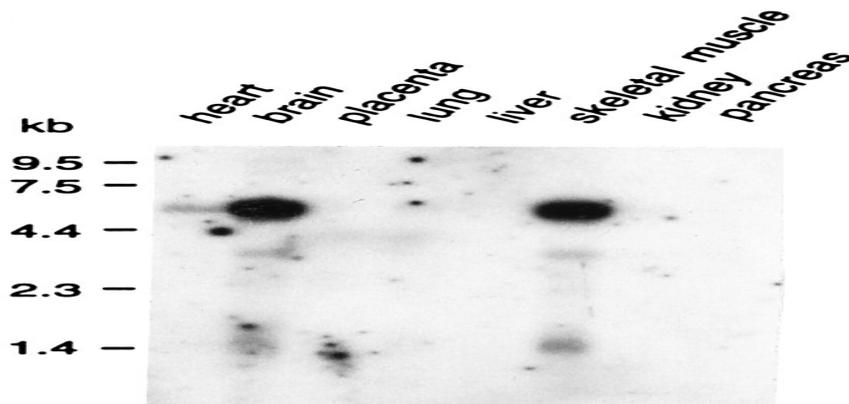


**Abb. 30: Northern Blot Proben-Auftragung**

Marker: 2 µl RNS-Dig-Marker II (Roche); Probenauftragung: je 4 ng Gesamt-RNS;

Hybridisierungstemperatur: 68 °C;

Sonde: Linearisierte Klon-53-Plasmid-DNS über T7-Polymerase



**Abb. 31: Gewebe-spezifische Detektion des AQP4-Transkripts bei humanen Proben**

2 %iger Northern-Blot humaner Biopsien. Deutlich ist die Gewebe-spezifische Expression des humanen Gesamt-mRNS-Transkripts zu sehen (Yang et al, 1995).

Ein wichtiger Befund dieser Studie besteht darin, dass sowohl im neben den bekannten humanen AQP4-Isoformen , auch im Kaninchen-Gewebe AQP4-Protein-Isoformen nachgewiesen wurden. Die Größe der zur Translation benötigten RNS betrug für humanes Myokard-Gewebe 6 kb (Hasegawa et al., 1994a) und für Kaninchen 5,5 kb (Abb. 30). Die über Northern-Blots bestimmte RNS-Größe des AQP4-Wasserkanal-Proteins für unterschiedliches humanes Gewebe (Abb. 31) wurde von verschiedenen Autoren beschrieben (Yang et al., 1995; Hasegawa et al., 1994b).

## 4. Diskussion

### 4.1 Isolierte Herzmuskelzellen als biologisches Modell

Das von Langendorff (Langendorff, 1895) in die experimentelle Kardiologie eingebrachte Modell des isoliert-perfundierten Herzens hat sich für die Untersuchung zahlreicher Stoffwechselfvorgänge als ausgesprochen fruchtbar erwiesen. Andererseits erfüllen homogene Populationen isolierter Kaninchen-Myozyten durch den Wegfall extrazellulärer Diffusionsbarrieren und somit durch den freien Zugang zur Zellmembran und das Fehlen hormoneller und neuraler Einflüsse bei gleichzeitig erhaltenem Stoffwechsel die Anforderungen zur Untersuchung von Stoffwechselfvorgängen in idealer Weise. Studien dokumentieren die strukturelle und funktionelle Vergleichbarkeit isolierter Zellen mit dem intakten Gewebe (Dow et al., 1981). Deshalb wurden isolierte Kardiomyozyten des adulten Kaninchenherzens als Modell für die Untersuchung molekularer Aspekte der Expression von myokardialen Aquaporinen (AQPs) gewählt.

Die bisher übliche Präparationstechnik wurde durch die Isolierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -toleranten Zellen verbessert (Eckel and Reinauer, 1983; Dispersyn et al., 2001). Die *in situ* Perfusion mit Kollagenase lieferte eine weitgehend homogene Population von Kardiomyozyten in hoher Ausbeute und mit hoher Anfangsvitalität. Die Kardiomyozyten waren gegenüber exogenem Kalzium ausgesprochen tolerant und blieben auch bei längeren Inkubationszeiten im Induktions-Puffer bei 20 °C energetisch vital (Abb. 6).

Die Reproduzierbarkeit des Verfahrens hängt im Wesentlichen von der Qualität der verwendeten Kollagenase ab. Die anschließende Aufarbeitung der isolierten Kardiomyozyten bewirkte eine selektive Eliminierung abgerundeter und alternierter stäbchenförmiger Zellen und somit eine signifikante Erhöhung der Vitalität der Zellpopulation. Vermutlich beruht die  $\text{Ca}^{2+}$ -Toleranz der Zellpräparationen auf dem niedrigen  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ -Verhältnis, da hohe intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen einen raschen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  und möglicherweise einen „ $\text{Ca}^{2+}$ -Overload“ im Austausch gegen  $\text{Na}^+$  bewirken, denn  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Myozyten lassen sich durch Erniedrigung des  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ -Verhältnisses in  $\text{Ca}^{2+}$ -tolerante Myozyten umwandeln (Altschuld et al., 1982; Jacobson and Duchon, 2004). Andererseits lassen sich  $\text{Ca}^{2+}$ -tolerante Zellen durch Blockieren der  $\text{Na}^+$ -Pumpe mit Ouabain in  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Zellen umwandeln (Haworth et al., 1982). Damit wäre die  $\text{Ca}^{2+}$ -Toleranz adulter Herzzellen keine inhärente Eigenschaft der Kardiomyozyten, sondern hinge von der funktionellen Integrität des Sarkolemm und dem damit verbundenen

Erhalt normaler Ionengradienten ab (Murata et al., 2001). Dadurch wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -Toleranz auch zu einem Kriterium für die Qualität einer Zellpräparation.

Die strukturelle Organisation frisch isolierter Kaninchen-Kardiomyozyten und die Morphologie ihrer subzellulären Organellen zeigten in Übereinstimmung mit der Literatur innerhalb der 90-min Versuchsdauer keine signifikanten Unterschiede zum intakten Herzwewebe (Clark et al., 1978; Vahouny et al., 1979; Dispersyn et al., 2001; Asano et al., 2003). Die Kultivierung frisch isolierter Herzmuskel-Zellen von adulten Kaninchen bereitete allerdings zunächst Schwierigkeiten. Nach einer 3-h Inkubationszeit in Primärkultur zeigten einige Zellen ein rasches Abrunden und eine strukturelle Dedifferenzierung, welche bereits für kultivierte Ratten-Kardiomyozyten beschrieben wurde (Powell et al., 1978; Dow et al., 1981). Bei diesen Studien erfolgten die Dedifferenzierungen sowohl während der Präparation von  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven als auch bei der Kultivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -toleranten Ratten-Kardiomyozyten (Piper et al., 1982). Andere Arbeitsgruppen zeigten für isolierte Kaninchen-Kardiomyozyten, wie sehr die Adhärenz der Zellen in Primärkultur von der Wahl der Aufschlussmedien, den Puffern und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Toleranz abhing (Haddad et al., 1988). So bewirkte die Inkubation einer derartigen Zellpräparation in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Kulturmedium ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Paradox; dieses ist auch als Hyperkontraktion bekannt (Powell et al., 1978).

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 8 A und 8 B) zeigen kultivierte Kaninchen-Kardiomyozyten mit über- bis hyperkontrahierter struktureller Organisation und teilweise intakten Mitochondrien (Hackenbrock, 1968). Die Abb. 8 B zeigt ein kondensiertes Stadium (nach Hackenbrock) (Perkins and Frey, 2000) von normoxischen Kardiomyozyten mit geringer Mitochondrienmatrix, welches mit einer ATP-Synthese verbunden sein könnte (Perkins and Frey, 2000; Wagner et al., 2003).

Unsere Beobachtungen sind nicht vergleichbar mit früheren Befunden anderer Arbeitsgruppen (Armstrong and Ganote, 1995; Kelso et al., 2000; Dispersyn et al., 2001), da sich in deren Zellaufschlüssen  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Zellen befanden, die für die Primärkultur verwendet wurden. Auch wurden die morphologische und ultrastrukturelle Organisation der Zellen nicht unter metabolischen Interventionen betrachtet. Unsere Licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass die Population der frisch isolierten Zellen überwiegend aus zylindrischen Zellen besteht, deren strukturelle Eigenschaften mit *in situ* Kardiomyozyten vergleichbar waren.

Nach Überführung der für die weiteren Versuche notwendigen  $\text{Ca}^{2+}$ -toleranten Zellen in die Primärkultur ergab sich die auffälligste strukturelle Veränderung. Diese äußerte sich

als Schwellung der Mitochondrien nach 24 h und nach einer pharmakologisch induzierten Ischämie und verursachte während der Kultur einen bisher unerklärlichen Matrix- und Cristaeverlust. Somit eignen sich  $\text{Ca}^{2+}$ -tolerante Kaninchen-Kardiomyozyten bei Verwendung eines modifizierten Powell-Puffers nicht für die Primärkultur.

#### 4.2 Charakterisierung von Kaninchen-Kardiomyozyten mit stabiler AQP-Expression

Neben der strukturellen Integrität wurde in der vorliegenden Arbeit auch die metabolische AQP-Aktivität frisch isolierter Kaninchen-Kardiomyozyten unter definierten pharmakologischen Bedingungen nachgewiesen. Wir haben bereits früher isolierte Kaninchen-Kardiomyozyten (Calvo Sanchez et al., 2004) und ventrikuläres Myokard (Birkenkamp-Demtröder et al., 2003) zur Analyse der AQP-Protein-Expression verwendet. Frisch isolierte Kaninchen-Kardiomyozyten und humanes kardiales Biopsie-Material weisen eine deutliche AQP1- und AQP4-Expression auf, die sich mit konfokalen-Immunfluoreszenz-Aufnahmen mit Anti-AQP1- und Anti-AQP4-gerichteten Antikörpern an isolierten Kardiomyozyten (Abb. 5) und Immuneduktions-Analysen im Western-Blot nachweisen lassen.

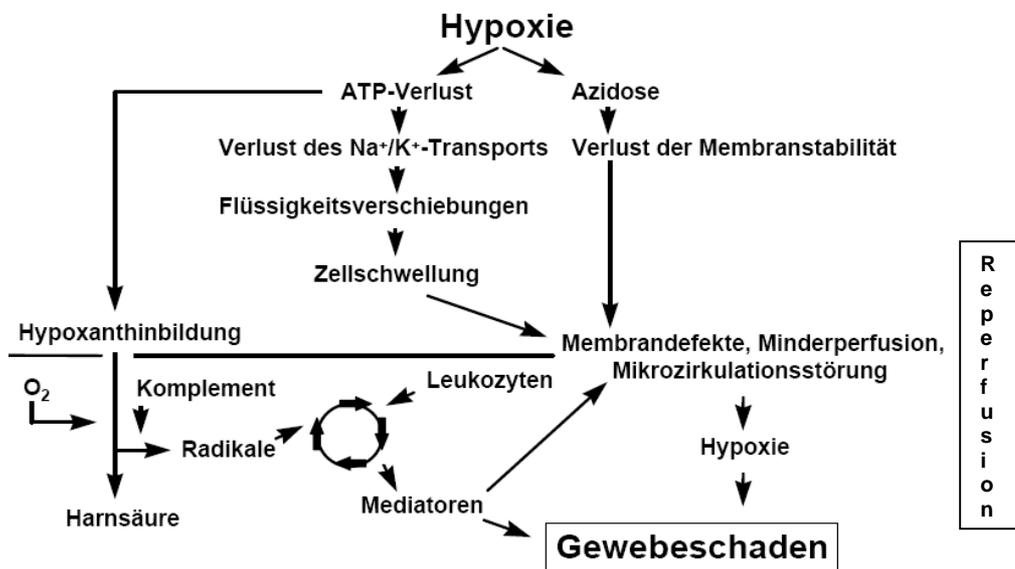
Anders verhält es sich jedoch bei kultivierten  $\text{Ca}^{2+}$ -toleranten Kardiomyozyten. Nach unseren Untersuchungen ist das AQP1- und AQP4-Transkript nach 24-h Primärkultur durch die Dedifferenzierung der Kardiomyozyten drastisch vermindert. Während einer zusätzlichen pharmakologischen Ischämie degradieren die Mitochondrien, und das Volumen nimmt zu (Abb. 7). Die Methode der Zellpräparation ( $\text{Ca}^{2+}$ -tolerante Zellen entwickelten eine Hyperkontraktion) schließt also die sinnvolle Nutzung kultivierter Kaninchen-Kardiomyozyten gegenüber frisch isolierten Zellen, für pharmakologische Langzeit-Studien aus. Es waren deutliche Membrandefekte an den äußeren Membranen zu erkennen, wie sie bei Endstadien der Ischämie oder bei Radikalbildung auftreten können (Asano et al., 2003). Apoptose wurde nicht beobachtet (D'Herde et al., 2000; Dispersyn and Borgers, 2001).

Vergleichbare Beobachtungen bezüglich der mitochondrialen Degradierung wurden auch an Adipozyten in Langzeitkulturen gemacht (Gerrits et al., 1993). Somit waren die isolierten Kaninchen-Kardiomyozyten in Primärkultur im Gegensatz zu den frisch isolierten Kardiomyozyten für weitere Untersuchungen zur Aquaporin-Expression im Langzeit-Experiment ungeeignet.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausgewählte Parameter der pharmakologischen Induktion an stabilen, Wasserkanalproteine-exprimierenden, frisch isolierten Myozyten charakterisiert. Die Ergebnisse legen nahe, dass frisch isolierte, adulte Kardiomyozyten als experimentelles Modell für die Untersuchung der Expression von Wasserkanal-Proteinen am Kaninchen Myokard gut geeignet sind.

### 4.3 Translokation und Lokalisation der AQPs in Kardiomyozyten

Eine pharmakologisch induzierte Ischämie führt zu einem signifikanten Anstieg der AQP1-Proteine (23 kDa) in mikrosomalen Membranen isolierter Zellen des linken Ventrikels. Während der Ischämie führte der Sauerstoff- und Glukose-Mangel innerhalb der Mitochondrien zu einem intrazellulären Energieverbrauch, der den Erhalt des zellulären Membranpotenzials beeinträchtigt (Harvey et al., 1988). Eine derartige Ischämie ist ein komplexer pathophysiologischer Prozess (Abb. 32: Hypoxie / Reperfusion). Experimentelle Verfahren machten deutlich, dass eine Modulation zahlreicher Funktionen ausgelöst wird, die eine Dysfunktion und eine mikrozelluläre Minderperfusion in den Kardiomyozyten hervorruft (Sato et al., 2000b; Murata et al., 2001; Liu et al., 2001b).



**Abb. 32:** Vereinfachtes Schema der Pathophysiologie des Ischämie-Reperfusionsschadens am Myokard (Post and Messmer, 1996).

Besonders früh ist die Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup>-ATPase betroffen, die einen Großteil des durch die oxidative Phosphorylierung bereitgestellten ATPs für den energieabhängigen Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup>-Antiport benötigt (Silver and Erecinska, 1994). Die Aktivierung spannungsabhängiger

Ionenkanäle an den Membranen bewirkt einen Einstrom von Ionen in die Zelle, wodurch unter anderem  $K^+$ -Ionen die Zelle verlassen können. Diese Ionenverschiebungen führen zu einem Wassereinstrom mit Ausbildung eines intrazellulären Ödems, dessen Ausmaß von der Sensitivität der  $Na^+ / K^+$ -ATPase (Martin et al., 1972) und der Aktivierung der Wasserkanalproteine (Suleymanian and Baumgarten, 1996; Diaz et al., 1999) abhängt. Es wäre denkbar, dass der Ischämie-induzierte Wassereinstrom die AQP1-Protein-Expression aktiviert, um so das Ausmaß eines intrazellulären Ödems zu minimieren. Die Expression der AQP1- und AQP4-Wasserkanal-Proteine beschränkte sich in diesen Untersuchungen auf die mikrosomalen Membranen der isolierten Kardiomyozyten.

Die elektronenmikroskopischen Abbildungen (Abb. 7) verdeutlichen die Auswirkungen einer pharmakologischen Ischämie. Die Schwellung der Mitochondrien weist auf einen starken Wassereinstrom hin. Der durch Diazoxid hervorgerufene kardioprotektive Effekt (= Öffnen ATP-sensitiver  $K^+$ -Kanäle) (Walsh et al., 1994; Tomai et al., 1994; Liu et al., 1996) beinhaltete keine Veränderungen in Bezug auf die Aquaporin-Expression (Abb. 11 und 33). Vermutlich verfügt die Zelle nach der Triggerung der Kanäle durch Diazoxid über ein erhöhtes Energiereservoir (Murata et al., 2001), wodurch eine Schwellung der Zelle und eine damit verbundene erhöhte AQP1-Expression ausbleibt. Das Öffnen der Kanäle regt schließlich die mitochondriale Respiration und damit die ATP-Produktion an (Liu et al., 1996). Ein spätes Öffnen der Kanäle nach Inhibition führte zu einer tendenziellen Erhöhung der AQP1-Expression. Eine zeitlich verzögerte Triggerung der Kanäle nach pharmakologischer Ischämie scheint sich nicht positiv auf die Verhinderung des Wassereinstroms auszuwirken. Unklar ist, weshalb trotz eines coexistierenden Aquaporins (AQP4) lediglich AQP1-Proteine vermehrt exprimiert wurden. Andererseits wurde durch immunologische Antikörper-Analysen eine Mehrfachamplifikation der AQP4-Proteine ermittelt, was das Vorhandensein von AQP4-Isoformen im Kaninchen-Myokard nahe legt (Yang et al., 1995; Yang et al., 1996; Sobue et al., 1999; Nakahama et al., 1999; Nakahama et al., 2002; Furman et al., 2003; Silberstein et al., 2004).

Unklar ist auch, weshalb die Ergebnisse nur für Zellen des linken Ventrikels ermittelt wurden. Dieser Befund weist vermutlich auf differenzierte zelluläre Aufgaben im Säugermyokard hin, die für die beiden Ventrikel verschieden sind.

Die Befunde zur Lokalisation der AQPs stehen im Widerspruch zu Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die an verschiedenen Spezies durchgeführt wurden (Moon et al., 1997; Nielsen et al., 1997b; Agre et al., 1999; Sui et al., 2001; Burghardt et al., 2003). In diesen Untersuchungen wird deutlich, dass durch veränderte physiologische Bedin-

gungen einige membranständige Aquaporine von der mikrosomalen Membran zur Plasmamembran transloziert werden. Wir konnten mit immunologischen Verfahren keine AQP1-Proteine auf der Plasmamembran der Kaninchen-Kardiomyozyten detektieren. Dadurch blieb unklar, ob bei Bedarf eine intrazelluläre Translokation der AQP1-Proteine von der mikrosomalen Membran-Fraktion zur Plasmamembran stattfindet (Abb 33). Da von uns AQP4 auch nicht in der Plasmamembran der Kaninchen-Kardiomyozyten detektiert wurde, liegt der Verdacht nahe, dass weitere Aquaporine an der Wasserregulierung im Säugetiermyokard beteiligt sein könnten, die vermutlich nach deren Expression überwiegend an der Plasmamembran transloziert werden und dadurch den Wasseraustritt aus dem Sarkolemm regulieren.

Die zugrunde liegenden Mechanismen zur Umverteilung von Aquaporinen in der Zelle sind noch unklar. Allerdings existieren einige Studien, die die Translokation von Aquaporinen in einigen Gewebetypen (überwiegend in der Niere) beschreiben (Echevarria et al., 1994b; Yamashita et al., 2000; Valenti et al., 2000). Die Frage, ob funktionsfähige Proteine in einem „Membran-Shuttle“ (Katsura et al., 1995) zur apikalen Membran transportiert und nach Beendigung ihrer Aufgaben aus dieser Membran wieder entfernt werden, ist noch unbeantwortet. Vermittelt wird dieser Effekt vermutlich durch eine Reihe intrazellulärer Signale. Den initialen Schritt in der Translokationskaskade könnte durch GLUT4 - einem überwiegend Glukose, Proteine und andere Stoffe transportierendes Vesikel - vermittelt werden (Till et al., 1997; Kolter et al., 1992; Nishino et al., 2004).

#### **4.4 Bedeutung der mitochondrialen ATP-abhängigen Kalium-Kanäle**

Es ist nach wie vor unklar, über welche zellbiologischen und zellphysiologischen Mechanismen die Präkonditionierung einer Zelle über  $\text{mito-K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle zu Stande kommt, und welche Auswirkungen sie auf die Aquaporin-Expression hat.

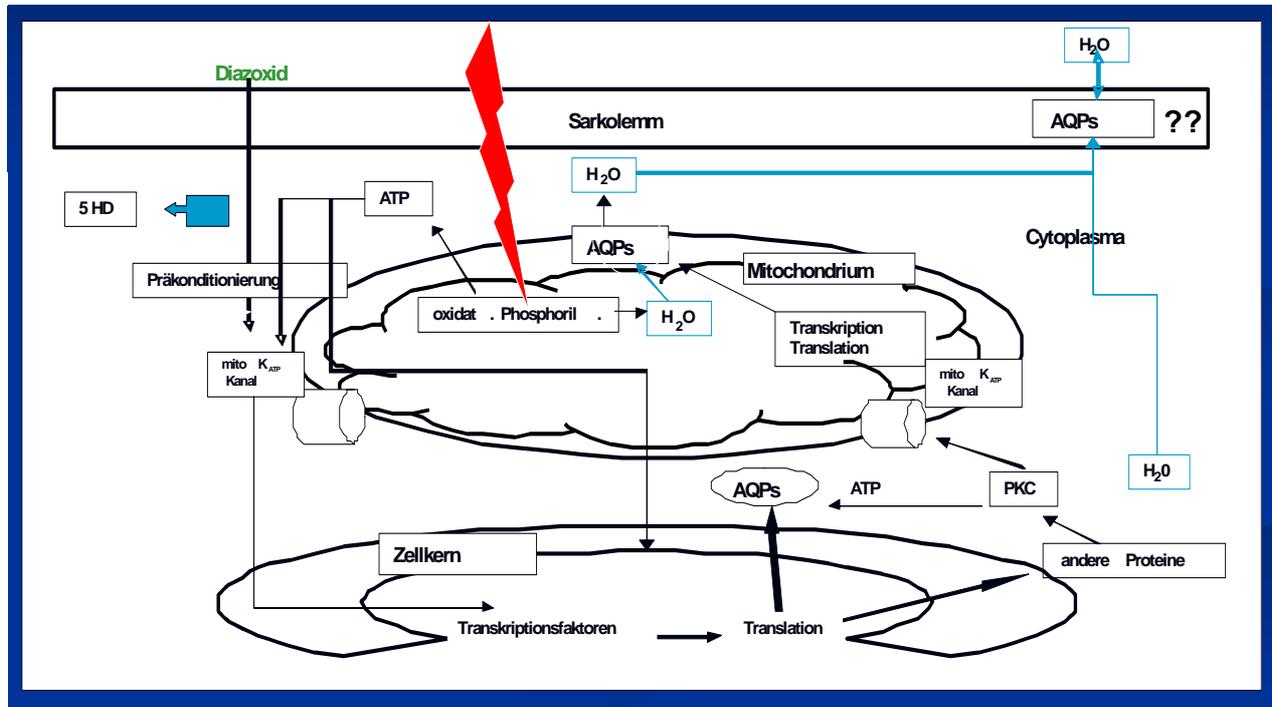
Mitochondrien pumpen Protonen aus dem Innenraum und erzeugen dadurch einen elektrochemischen Gradienten für Protonen und ein negatives Potenzial über die innere Mitochondrienmembran (Alberts et al., 1995). Neben der Funktion als zellulärer Energielieferant sind Mitochondrien ein Glied in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalkaskade. Indem sie zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  aufnehmen und umverteilen, agieren sie als potente  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer (Crompton and Costi, 1988; Miyamae et al., 1996; Wang et al., 2001a). Eine Inhibierung der Mitochondrien beeinträchtigt die Atmungskette und löst längerfristig Apoptose in den Zellen und folglich eine Nekrose des Gewebes aus.

NaCN-1,2 Deoxyglukose (NaCN) lässt sich als experimentelles Werkzeug benutzen, um eine pharmakologische Ischämie auszulösen. Es fungiert als Ligand der Deoxyglukose und wird von den Zellen wie Glukose aufgenommen. NaCN greift eine Vielzahl von eisenhaltigen Enzymen an und sorgt für eine metabolische Inhibierung in den Zellen. Es führt zu einem intrazellulären Sauerstoffmangel und in der Folge zu einem ATP-Verlust. Diese "Ischämische Wirkung" und der damit verbundene Zusammenbruch des Energiestoffwechsels findet primär an den Mitochondrien statt.

Um die isolierten Kaninchen-Kardiomyozyten zu präkonditionieren, wurde der  $\text{mito-K}_{\text{ATP}}$ -Kanalöffner Diazoxid verwendet (Ashcroft, 1988; Gross and Auchampach, 1992; Auchampach and Gross, 1993; Mullenheim et al., 2001; Das and Sarkar, 2003; Pollesello and Mebazaa, 2004; Calvo Sanchez et al., 2004; Downey, 2004). Es ist gut vorstellbar, dass eine partielle Öffnung der  $\text{mito-K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle einen partiellen Kollaps des transmembranären Gradienten in den Mitochondrien hervorruft. In der Folge wird ein Teil des Sauerstoffs nicht zur ATP-Produktion genutzt, sondern in geringen Mengen als Sauerstoffradikale freigesetzt (McPherson and Yao, 2001; Krenz et al., 2002). Diese führen zu keinerlei Schädigung, sondern fungieren als Signalmoleküle, die die Proteinkinasen aktivieren und zum Zellschutz beitragen. Fast alle Mediatoren der Präkonditionierung (Bradykinin, Opioide, Angiotensin) signalisieren über diesen Weg (Quast and Cook, 1989a). Adenosin bildet eine Ausnahme, denn es fungiert als endogener Trigger nicht über Mitochondrien und bedient sich nicht kleiner Radikal-Mengen zur Protektion (Auchampach and Gross, 1993; Sato et al., 2000a; Liu et al., 2001a).

Weitere Studien zur Steuerung der  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanäle durch das vasodilatative und kardioprotektive Diazoxid als Kanalaktivator belegen das Auftreten reperfusorischer Zustände nach NaCN-induzierter Ischämie in den Zellen (Walsh et al., 1994). Diese Zustände betreffen die Regulierung des Zellvolumens und der damit verbundenen AQP-Expression (Tomai et al., 1994; Calvo Sanchez et al., 2004). Nach Öffnen der  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanäle durch Diazoxid, wird durch eine Hyperpolarisierung der Plasmamembran der Mitochondrien (Quast and Cook, 1989b; Murata et al., 2001) eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Anreicherung innerhalb der mitochondrialen Matrix und im Zytosol während einer pharmakologischen Ischämie durch NaCN verhindert. Dieser Vorgang wirkt sich nicht negativ auf die Zelle aus (Trube and Rorsman, 1986). Eine Verminderung der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration während einer pharmakologischen Ischämie / Reperfusion gilt als Maßnahme zur Protektion und verzögerten zellulären Apoptose (Miyamae et al., 1996; Di Lisa et al., 1998; Di Lisa and Bernardi, 1998). Gleichzeitig wird auch die Glukose-stimulierte Insulin-Sekretion

inhibiert. Die Hyperpolarisation der mitochondrialen Plasmamembran infolge der verkürzten Aktionspotenziale (Liu et al., 1996) wirkt sich durch Diazoxid selektiv auf die  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanäle und nicht auf die Sarkolemm- $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle der Zelle aus (Sato et al., 2000b). Dieser Effekt regt die mitochondriale Respiration an, wodurch Wasser in den Zellen nicht angereichert und somit eine erhöhte AQP-Expression vermieden wird.



**Abb. 33: Modell zu Versuchsaufbau und Wirkungsmechanismus pharmakologischer Induktionen an isolierten Kardiomyozyten**

#### 4.5 Regulation der AQP-Protein-Expression durch die Proteinkinase-C

Eine wichtige Funktion der Proteinkinasen ist die Phosphorylierung von Proteinen. An Ratten-Kardiomyozyten führt die Proteinkinase-C (PKC) über eine Protein-Phosphorylierung zur Protein-Translokation (Liu et al., 1996). Unterstützt wird diese Interaktion durch die  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanäle (Liu et al., 1995). Es wurde untersucht, ob die PKC für eine gesteuerte AQP1- oder AQP4-Expression an isolierten Kaninchen-Kardiomyozyten mitverantwortlich ist.

Die Aktivierung der Proteinkinasen gilt als einer der Mechanismen der pharmakologischen Präkonditionierung in Kardiomyozyten (Hu et al., 1999; Liu et al., 1996; Mayr et al., 2004). Dabei spielen verschiedene Mediatoren – Opoide, Phorbolster und Adenosin – eine tragende Rolle (Liu et al., 2001a). Geeignete Phorbolster aktivieren eine

Anzahl G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, setzen intrazellulär NO und Sauerstoffradikale frei, aktivieren die PKC und öffnen schließlich  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanäle, die Endeffektoren der Präkonditionierung (Kirsch et al., 1990; Hu et al., 1999; Wang et al., 1999; Krenz et al., 2002; Mayr et al., 2004).

Wir untersuchten die Wirkung des Phorbolesters PMA auf die PKC-Aktivierung und die AQP-Expression. Nach Aktivierung der PKC war lediglich die AQP4-Expression in rechts- und linksventrikulären Zellaufschlüssen signifikant erhöht, und die AQP1-Expression war in allen Protokollen tendenziell gegenüber Kontrolle verringert. Es ist daher interessant, welche Bedeutung der Phorbolester als Aktivator der Regulation der kardialen AQP4-Expression in isolierten Kardiomyozyten hat.

Die Konsequenz der Phosphorylierung der Wasserkanäle durch Proteinkinasen ist bislang unklar. Für eine Erhöhung der Wasserpermeabilität (Kuwahara et al., 1995) spricht die Beschreibung einer Phosphorylierungsstelle an den Wasserkanal-Proteinen (Mathai and Agre, 1999). Diese erhöhte Wasserpermeabilität konnte allerdings von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden (Echevarria et al., 1994a).

Bisher sind in verschiedenen Studien PKC-Effekte an unterschiedlichen Zelllinien untersucht worden: Phorbolester bewirkten an Insulinoma-Zellen einen konträren Effekt gegenüber anderen Studien (Dunne, 1994). Dabei hatte die aktivierte PKC die phosphorylierten  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanäle, die Endeffektoren der Präkonditionierung, sogar gehemmt. Diese Ergebnisse wurden durch weitere Arbeitsgruppen bestätigt (Kane et al., 1996). In einer Somazelllinie erzeugte die Aktivierung der PKC mit dem Phorbolester PMA eine gesteigerte Aktivität der  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanäle (de Weille et al., 1989b). Glibenclamid, ein anderer Phorbolester, hatte die gleiche aktivierende Wirkung auf die PKC, die an Katzen-Kardiomyozyten  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanäle aktivierte (Wang and Lipsius, 1995). Der Phorbolester Pinacidil inhibierte an Kaninchen-Kardiomyozyten nach PKC-Aktivierung die  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanäle (Light et al., 1995). Es zeigte sich, dass nur bestimmte PKC-Isoformen an der mitochondrialen Aktivierung der  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanäle beteiligt waren. Erst durch die Regulation einer PKC-Isoform an den Mitochondrien konnte Diazoxid als Effektor für die  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanäle fungieren. Eine Beteiligung kardialer PKC-Isoformen an der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen massiven Umorganisation der Wasserkanalproteine ist also durchaus denkbar.

Die PKC kann AQP4-Proteine phosphorylieren (Chou et al., 1998). Die Wirkung der PKC richtet sich nach Zelltyp, Art des gewählten Phorbolesters, der Konzentration und der Spezies. Eine erhöhte PKC-Aktivität ist immer mit einer erhöhten Phosphorylierung

verbunden, wodurch auch die  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanäle zum Öffnen angeregt werden. Die dadurch aktivierten Mitochondrien setzen Sauerstoffradikale frei (McPherson and Yao, 2001), die wiederum die intrazelluläre Signaltransduktion anregen (Ambrosio et al., 1995) und zu einer erhöhten Gen-Expression führen. Dies macht auch die erhöhte AQP4-Expression aus.

Die kardioprotektive Rolle der PKC bei ischämischer Präkonditionierung im Myokard wird aufgrund der vielen vorkommenden PKC-Isoformen kontrovers diskutiert. Vor allem PKC- $\epsilon$  wurde in der frühen Phase der Präkonditionierung als protektiv bei Kaninchen-Kardiomyozyten beschrieben. Das Verhalten der Kardiomyozyten gegenüber ihrer Osmolarität könnte dabei eine Rolle spielen, denn Kardiomyozyten ohne Präkonditionierung mit PKC- $\epsilon$  entwickelten während einer simulierten Ischämie osmotische Schäden (Liu et al., 1999).

Unsere Daten lassen vermuten, dass die aktivierte PKC das AQP1-Protein durch Inhibierung der AQP1-Expression reduziert. Welchen Effekt löst sie aber an AQP4 aus? An der recognitiven Seite des AQP4-Moleküls befinden sich potenzielle Phosphorylierungsstellen (Thr-107; Ser-111; Ser-180) (Jung et al., 1994a), deren Bedeutung noch unbekannt ist. An anderen Wasserkanälen ist die Bedeutung einer Phosphorylierung bereits besser untersucht. So ist AQP2 in der Niere von Hunden in intrazellulären Vesikeln lokalisiert, während eine phosphorylierte Form des AQP2 in der apikalen Membran lokalisiert ist (van Balkom et al., 2002). Der Transport von AQP2 zu den Vasopressin-sensitiven Vesikeln hängt von der Phosphorylierung ab, die durch die Aktivierung der PKC ausgelöst wird. Dabei regt die PKC eine Endozytose der AQP2-Vesikel an, damit diese phosphoryliert und zur apikalen Membran transloziert werden können.

An Rattenherzen wird die Phosphorylierung von AQP4-Proteinen über die mit Phorbol-estern aktivierte PKC reguliert (Han et al., 1998). Unsere Immunpräzipitation-Ergebnisse mit Anti-AQP4-AK weisen auf AQP4-Isoformen hin, wie sie auch von Han (1998) dokumentiert wurden. Dabei handelte es sich um unglykolisierte (31 kDa) und glykolisierte (40 und 45 kDa) Formen. Die Proteine der 31 kDa Form verringerten sich nach Zugabe der PKC-Aktivatoren in Richtung auf ein höheres Molekulargewicht. Han nahm an, dass die PKC eine Phosphorylierung der AQP4-Proteine vornehmen kann. In Untersuchungen an *Xenopus laevis* Oozyten verminderte eine PKC-Aktivierung die Wasserpermeabilität der AQP4-Proteine. Zur Kontrolle wurde eine Punkt-Mutation am Ser-180, der Phosphorylierungsstelle des AQP4-Proteins (Blom et al., 1999), durchgeführt und eine nicht AQP4-exprimierende Astrozyten-Zelllinie verwendet. Bei transfizierten Oozyten war die

Wasserpermeabilität in Anwesenheit eines PKC-Aktivators vermindert. Bei der Astrozyten-Zelllinie lag das AQP4-Protein in der basolateralen Membran der Zellen vor. Eine Phosphorylierung verursachte eine Herunterregulierung des AQP4-Proteins und führte damit zu einer Verminderung der Permeabilität. Es konnte jedoch kein deutlicher Effekt auf den Transport und die Translokation des AQP4-Proteins ermittelt werden.

Im Sammelrohr der Niere coexistieren AQP4 und AQP3. AQP3 hat eine andere dynamische Regulation, und seine Permeabilität kann mit einem saurem pH herunterreguliert werden (Zeuthen and Klaerke, 1999). Das ermöglicht den Zellen eine Wasserregulierung unter verschiedenen Konditionen.

Reversible Phosphorylierung ist der häufigste Weg, um Funktionen von Proteinen zu verändern (Cohen, 2000). Andere Versuchsgruppen liefern konträre Ergebnisse (Yang and Verkman, 1997), indem sie beschreiben, dass PKC-Aktivatoren (Phorbolster) keinen Effekt auf die Expression von AQP1, -2, -3, -4, -5 in *Xenopus*-Oozyten hatten, und eine Phosphorylierung keine Regulation dieser Proteine bewirkt.

Die Effekte der PKC auf Wasserkanalproteine wurden auch an kultivierten Ratten-Astrozyten untersucht (Yamamoto et al., 2001). Nach Aktivierung der PKC nahm die AQP4-mRNS Expression deutlich ab. Nach Gabe von geeigneten PKC-Inhibitoren war dieser Vorgang reversibel. Anhaltende Behandlung mit dem Phorbolster TPA sorgte für eine reduzierte TPA-Wirkung bezüglich der AQP4-mRNS-Verminderung, da die PKC-Wirkung wieder anstieg (Nakahama et al., 1999). Eine Inhibierung der Proteinbiosynthese durch Cyclohexamid verursachte keinerlei Verminderung von AQP4-mRNS nach TPA-Gabe. Die AQP-Inhibierung durch TPA erfolgt daher offenbar nur innerhalb der transkriptionalen Ebene, beeinflusste also die weitere AQP4-Protein-Synthese nicht. Die PKC spielt daher offensichtlich in Ratten-Astrozyten eine entscheidende Rolle bei der AQP4-Expression.

Gewisse Rückschlüsse lassen sich auf das Kaninchen-Myokard machen. Die AQP4-mRNS-Abnahme hing von der TPA-Dosis und der Zeit ab. Der Mechanismus zur Regulation der AQP4-mRNS-Verminderung in Ratten-Astrozyten ist allerdings nicht bekannt (Nakahama et al., 1999; Yamamoto et al., 2001; Nakahama et al., 2002).

Bei Ratten übernimmt die PKC die Stimulation der AQP4-Phosphorylierung und reduziert dadurch den AQP-abhängigen Wassereinstrom in die Astrozyten (Han et al., 1998). Für das ischämische Ratten-Gehirn existieren vermutlich zwei Regulationsmechanismen. Zum einen sorgt eine herunterregulierte PKC-Isoform für einen Anstieg des Wasserflusses über AQP4, oder die hochregulierte PKC-Isoform sorgt zum anderen für

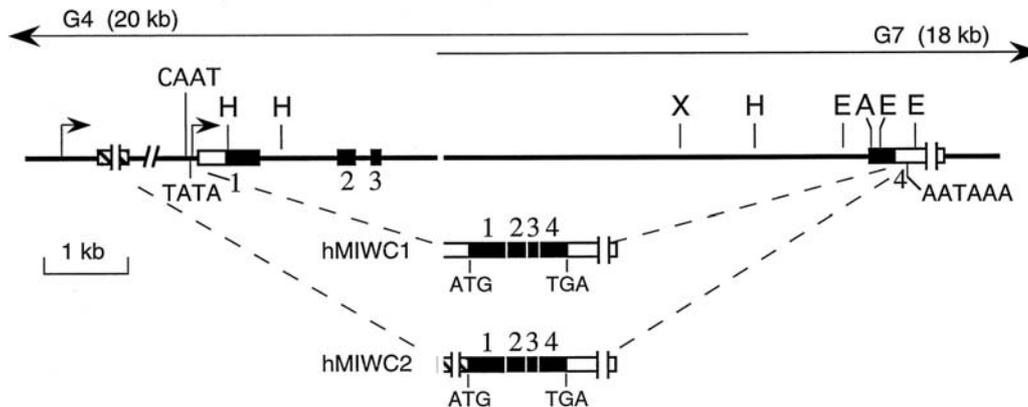
einen verminderten Wasserfluss nach Phosphorylierung der AQP4-Proteine (Kurkinen et al., 2001).

Signaltransduktionswege der klassischen PKC und der PKC-Isoenzyme konnten an der Regulierung der AQP4-Proteine nicht ermittelt werden. In Abhängigkeit vom Phorbol-ester als PKC-Aktivator findet eine PKC-vermittelte Expression der AQP4-Wasserkanalproteine statt. Eine erhöhte AQP-Expression lässt den Schluss zu, dass eine PKC-Aktivierung in Kaninchen-Kardiomyozyten eine schnelle Phosphorylierung der AQP4-Wasserkanäle und dadurch eine schnellere Regulierung der Osmolarität bei einer Wasserintoxikation ermöglicht. Eine PKC-vermittelte Translokalisierung der Wasserkanäle wurde nicht beobachtet. Phorbol-ester scheinen generell über die Aktivierung und Translokation phosphorylierbarer Proteine zu verfügen. Untersuchungen an unterschiedlichen Geweben und Zelltypen legen nahe, dass aktivierte PKC-Isoformen an der Reorganisation von Proteinen und damit verbundenen Wirkungsmechanismen beteiligt sind. Dabei können sie mit diversen Proteinkomponenten des Cytoskelettes assoziiert sein (Hu et al., 1999; Nishino et al., 2004). Die PKC-Aktivatoren, die Dosis, der Zelltyp und die Spezies führen zu Unterschieden in der Wirkungsweise und zu unterschiedlicher Signalinduktion innerhalb der Organismen.

#### **4.6 AQP4-Isoformen**

Die in Kaninchen-Kardiomyozyten detektierten Primer-Sequenzen korrelieren mit dem humanen MIWC-Gen (humane, fötale, cerebrale cDNS-Bibliothek Lambda gt10c DNS-Bibliothek; HL 3001a, Clontech) und sind analog zu der kodierenden Sequenz des Ratten-MIWC (Yang et al., 1995; Furman et al., 2003). Das humane MIWC-Gen (hMIWC) beinhaltet zwei überlappende Transkriptions-Einheiten, woraus multiple cDNSs für hMIWC entstehen (s. Abb. 34). Das hMIWC umspannt Exon1 bis Exon4. Das hMIWC2 unterscheidet sich von hMIWC1 durch eine veränderte 5'-Sequenz, welche wiederum für zwei unterschiedliche Startcodons codiert. Das hMIWC-Gen weist eine Consensus-Seite für eine N-gekoppelte Glykolisation und zwei Phosphorylierungsstellen für die PKC und PKA auf. Die Promoterregion für hMIWC1 und Transkriptions-Initiationsseiten und genomisch regulative Elemente wurde – zusammen mit dem Lokalisationsort am humanen Chromosom 18q22 – ausreichend analysiert (Yang et al., 1995). Das hMIWC2, welches über zwei weitere Phosphorylierungsstellen für die PKC verfügt, bildet die regulatorische Einheit des Gesamtgens. Zur Bildung beider Proteine

(32 und 34 kDa) wurde multiple mRNA transkribiert, welche über alternative Spleißverfahren und Exon-überspannende Translationen die überlappenden hMIWC-Proteine bilden.



**Abb. 34: Genomische Struktur des hMIWC (Yang et al., 1995).**

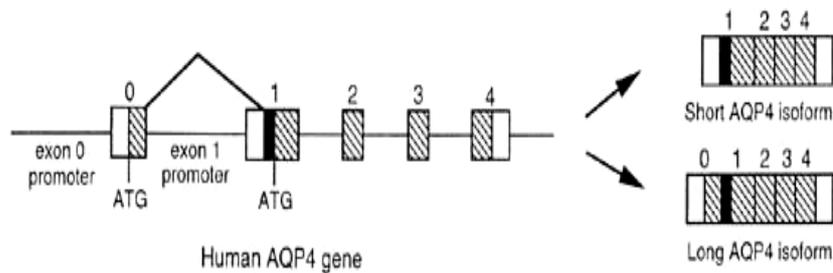
Die überhängenden genomischen Klone G4 und G7 sind analysiert (Yang et al., 1995). Abgebildet ist die Restriktionskarte für das hMIWC-Gen. Das Gen lässt sich durch zwei überlappende Transkriptionseinheiten beschreiben. Die Rechtecke symbolisieren kodierende Exon-Segmente (ausgefüllt), die auch nicht translatierte (leere) Sequenzen beeinhaltet. Die gestrichelten Rechtecke kennzeichnen ein alternatives "upstream" Exon-Segment, welches mit der Sequenz der 5'-Region des hMIWC2 cDNS-Klons korrespondiert. Der Lokalisationsort für die Isoformen wurde am humanen Chromosom 18q22 detektiert.

H: HindIII; X: XbaI; E: EcoRI; A: ApaI. (Restriktionsschnittstellen)

Der hMIWC-Primer hatte beim Kaninchen eine hohe Homologie zum humanen AQP4-Gen am Exon1. Diese Daten legitimieren die Anwendung der humanen Promoter-Primer-Sequenzen auf Kaninchen-Kardiomyozyten.

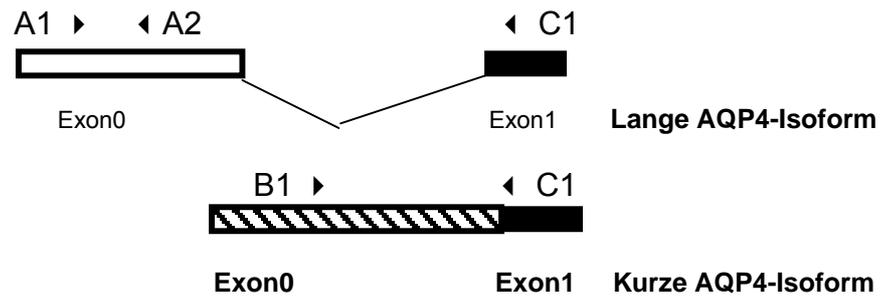
Die Primer-gerichteten humanen Promoter-Sequenzen (B1/C1; A1/A2; (Umenishi and Verkman, 1998)) zeigten eine deutliche Homologie zu dem humanen Genom aus der Lambda gt10c DNS-Bibliothek einer humanen, fötalen, cerebralen cDNS (MIWC; HL 3001a, Clontech). Sollten AQP4-Protein-Isoformen durch unterschiedliche N-terminale Sequenzen während des alternativen Spleißens produziert werden (Ma et al., 1996b; Lu et al., 1996), dann wäre interessant, ob humane Promotoren-Primer-Sequenzen an der Ausbildung von Kaninchen-Isoformen beteiligt sind. Abb. 35 und Abb. 36 veranschaulichen die AQP4-Gen-Struktur, die sich auf die vorliegenden Versuche stützt. Die kurze humane AQP4-Isoform wurde mittels mRNA vom Exon1 zum Exon4 transkribiert. Beim

Kaninchen wurde durch die Sequenzanalyse des B1 / C1-Primers ebenfalls ein partielles Exon0 und Exon1 gefunden, welche die kurze AQP4-Isoform ausbilden. Die lange AQP4-Isoform resultierte aus einem Spleißvorgang in das Exon0, welches mit einem Fragment des Exon1 involviert war. Dieses Ergebnis wurde beim Kaninchen nicht ermittelt. Eine weitere kurze humane AQP4-Isoform ergibt sich mit dem A1 / A2-Primer im Exon0. Diese konnte auch beim Kaninchen nachgewiesen werden. Dadurch wurden in den isolierten Kaninchen-Kardiomyozyten zwei Promotersequenzen im Exon0 und partiell Exon0 und Exon1 analysiert, die homolog zu den Promotersequenzen des humanen MIWC-Gens codieren.



**Abb. 35: Humanes AQP4-Gen (Umenishi, 1998)**

Die Exons wurden durchnummeriert und sind als Rechteck dargestellt. Untranslatierte Regionen sind als offene und gestreifte Rechtecke und kodierende Sequenzen als gestrichelte Rechtecke kenntlich gemacht. Die Sequenz, welche für die lange AQP4-Isoform in der untranslatierten Region des Exon1 codiert, ist geschwärzt gezeichnet.



**Abb. 36: Primer-gerichtete Promotoren Ableseraster**

Die für die Primer geltenden Amplifizierungsorte für die Promoterregionen sind innerhalb des humanen AQP4-Gens dargestellt.

Die Promoter-Startsequenz der A1 / A2-Primer befindet sich an einer anderen Stelle des Genoms als die B1 / C1-Primer-Sequenz. Die für das Kaninchen ermittelte Sequenz A1 / A2 zeigte keine „Overlay“-Sequenz zu unserer ermittelten Sequenz des hMIWC-Genoms. Es ist nicht bekannt, ob das AQP4-Gen seine Regulation über den alternativen Promoter des upstream Promoters-0 oder -1 erhält (s. Abb. 35). hMIWC besitzt zwei überlappende Transkriptions-Einheiten, woraus multiple cDNS für das hMIWC-Genom entstehen (s. Abb. 34). Diese Sequenzen konnten beim Kaninchen ebenfalls nicht detektiert werden.

Im Einklang mit Studien an anderen Spezies wurden in den vorliegenden Untersuchungen an adulten ventrikulären Kardiomyozyten von Kaninchen, die mit definierten Primern unterschiedliche DNS-Fragmente exprimierten, AQP4-Isoformen nachgewiesen. Studien, die sich mit der molekularen Regulation der AQP4-Isoformen befassen, beschreiben eine differentielle Regulation der verschiedenen AQP4-Spleißvarianten, welche offenbar durch unterschiedliche Signalmechanismen kontrolliert werden (Yang et al., 1995; Umenishi and Verkman, 1998). Die genauen Mechanismen, welche an der Regulation der AQP4-Spleißvarianten partizipieren, sind zurzeit noch unbekannt.

Die AQP4-Isoformen unterscheiden sich von anderen Wasserkanälen durch alternatives Spleißen des Primärtranskripts, welches die Synthese von verkürzten membranständigen und von sezernierten Molekülen erlaubt (Umenishi and Verkman, 1998). Sollten die AQP4-Protein-Isoformen durch unterschiedliche N-terminale Sequenzen während des alternativen Spleißens produziert werden (Ma et al., 1996b; Lu et al., 1996), dann wäre zu klären, ob die verkürzten AQP4-Isoformen auf der Oberfläche der

Kardiomyozyten exprimiert werden. Unsere Versuche konnten diese Frage nicht beantworten. Vielmehr wurden die AQP4-Isoformen an mikrosomalen Membranen detektiert.

Eine AQP4-Expression an der Zelloberfläche erfordert neben verschiedenen Schritten im endoplasmatischen Retikulum, welche die Beladung mit Peptidliganden veranlassen, auch den Transport durch den Golgi-Apparat, um die Zelloberfläche zu erreichen (Kurth-Kraczek et al., 1999; Martin et al., 1999). Ein geeigneter Kandidat für die Signaltransduktion wäre die PKC, und ein geeignetes Transportprotein wären die GLUT4-Vesikel (Till et al., 1997; Uphues et al., 1994; Hashiramoto and James, 2000; Nishino et al., 2004) oder die Calveolin-Vesikel (Hellstrom et al., 2001; Page et al., 1998).

Die Beteiligung akzessorischer Proteine an der Translokation humaner AQP4-Isoformen an die Zelloberfläche als Reaktion auf einen Stimulus wird zurzeit kontrovers diskutiert und muss weiter untersucht werden. Es ist allerdings denkbar, dass die AQP4-Isoenzyme in Assoziation mit anderen Proteinen an die Zelloberfläche oder an die intrazellulären Membranen gelangen. Wir konnten am Kaninchen-Myokard weder eine Translokation der AQP4-Isoenzyme noch eine Beteiligung der PKC als Signalinduktor feststellen.

Das Protein T1 $\alpha$  tritt in der Plasmamembran alveolärer Epithelzellen bei Ratte, Maus und Mensch in zwei Isoformen auf. Obwohl die genaue Funktion nicht bekannt ist, ist es am Flüssigkeitstransport in der Lunge beteiligt (Ma et al., 1998; Kuwahara et al., 1995). Lange lag der Verdacht nahe, das T1 $\alpha$ -Isoformen als coexprimierte Proteine eine Regulationsfunktion bei Wasserkanälen ausführen (Ma et al., 1998). Durch cDNS-Analysen wurde jedoch nachgewiesen, dass T1 $\alpha$ -Proteine zwar eine Coexpression mit anderen Aquaporinen wie AQP1 (Hasegawa et al., 1994a) oder AQP5 (Frigeri et al., 1995b) eingehen, aber deren Funktion nicht beeinflussen. T1- $\alpha$  könnte also eine Coexpression mit AQP4-Proteinen eingehen, die aber weiter untersucht werden müsste.

Eine altersabhängige Expression unserer humanen juvenilen und adulten Herzproben auf die AQP4-Isoformen wurde nicht ermittelt. Überraschend war jedoch, dass sich die in den Kaninchen-Kardiomyozyten ermittelte Intensivität der Sequenz-Expressions-Profile der Promotorregionen stark von der Intensität der humanen Profile in Gehirn und Niere unterschieden. Die Kaninchen B1 / C1-Primer-Expression war stärker als die humane Expression in Gehirn und Niere (Abb. 28), und die Kaninchen A1 / A2-Primer-Expression war gegenüber der humanen Expression etwas erhöht. Die A1 / C1-Primer-Expression, welche im humanen Gehirn an Expressionsintensivität überwog (Abb. 28), konnte im

Kaninchen nicht detektiert werden (Abb. 27). Dadurch lassen sich an den Spezies klonale Unterschiede der Spleißvarianten aufzeigen. Es konnten am Kaninchen-Myokard drei Sequenz-Expressionsprofile ermittelt werden, was jedoch weitere, am Aufbau beteiligte Promoter-gebundene Spleißvarianten nicht ausschliesst. Diese beruhen möglicherweise auf einer unterschiedlich starken Expression des stimulatorisch wirkenden Promoters auf Kardiomyozyten.

Die transkriptionale Aktivität des Exon0-Promoters ist deutlich höher als die des Exon1-Promoters, denn der Immunoblot (Abb. 27) zeigte eine stärkere Expression der kurzen AQP4-Protein-Isoform (angeregt durch den Promoter des Exon0) als der langen AQP4-Isoform (Nielsen et al., 1997b; Terris et al., 1995). Folge: Die Promoter-Aktivität ist ein möglicher Faktor für die höhere Expression der kürzeren AQP4-Protein-Isoform im Kaninchen-Myokard. Die Kardiomyozyten müssen demnach spezifische Faktoren freisetzen, die eine Erhöhung der Exon0-Transkription und dadurch eine Expression der AQP4-Protein-Isoform hervorrufen.

Alle Isoformen werden kopräzipitiert und sind am Aufbau der Domänen des gesamten AQP4-Proteins beteiligt. Die Frage, ob die verkürzten AQP4-Isoformen eine biologische Funktion haben, wird noch immer kontrovers diskutiert. Nach Versuchen von Yang (Yang et al., 1995) haben beide hMIWC-Isoformen eine wasserführende Funktion; dennoch ist der Grund für die Synthese nicht bekannt.

Um diese Frage zu klären, muss der Verlust von AQP4-Isoformen in Tier-Modellen (Oozyten, Mäuse, Ratten, Kaninchen etc) als Transfektanten bestätigt werden. Knock-out-Tiere könnten weitere Aufschlüsse über die Funktion der Aquaporine im Myokard liefern. Die bisherigen Ergebnisse über den Verlust von Aquaporinen in anderen Geweben sind kontrovers und werden später diskutiert (s. 4.7).

#### **4.6.1 Orthogonal arrays of particles (OAPs).**

Zu den OAPs wurden in der vorliegenden Arbeit keine Untersuchungen durchgeführt. Weil diese orthogonalen Felder aber vermutlich eng mit dem AQP4-Protein assoziiert sind, wird kurz auf sie eingegangen.

Mit der Elektronenmikroskopie wurden vor mehr als 30 Jahren an Plasmamembranen verschiedener Säugetiere regelmäßige quadratische Felder entdeckt (Landis and Reese, 1974). Diese Strukturen lagen häufig in der Nähe von Kapillaren und wurden zunächst als intramembranäre Partikel (IMPs) bezeichnet. An AQP4-beihaltenden Geweben bildeten sie eine Anordnung aus orthogonal ausgerichteten Partikeln, die als „square

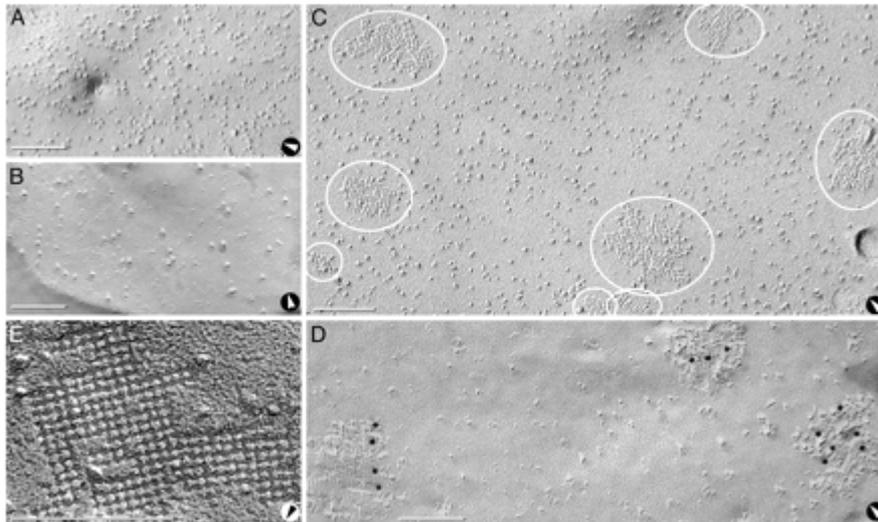
arrays“ bekannt wurden (Verbavatz et al., 1993). OAPs mit identischer Ultrastruktur aber unterschiedlicher Flächengröße wurden in den verschiedensten Geweben entdeckt: in Langerhans-Zellen der Niere (Orci et al., 1981; Nakamura and Nagano, 1985), in Epithelzellen der Trachea (Widdicombe et al., 1987), im Darm (Staehein, 1972), im Magen (Bordi et al., 1986; Misaka et al., 1996), in Astrozyten (Landis and Reese, 1974; Neuhaus, 1990; Neuhaus et al., 1990; Rash et al., 2004) und im Skelettmuskel (Verbavatz et al., 1997). An Membranen isolierter Kardiomyozyten wurden bisher allerdings keine OAPs gefunden.

An den Objektivfasern der Augenlinsen sind große IMPs in Coexpression mit dem Wasserkanal MIP26 entdeckt worden. MIP26 ist ein Wasserkanal-Protein, welches nur in der Augenlinse vorkommt und bevorzugt in Coexistenz an der Plasmamembran anderer Zelltypen mit AQP1-Expression auftritt. (Gorin and Goodman, 1985). OAPs traten bisher nur bei Coexistenz mit dem AQP4-Wasserkanal auf. Ein Verlust der IMPs und der OAPs führt im Auge der Maus zu Katarakten (Shiels and Bassnett, 1996). Identität und Funktion von OAPs in anderen Geweben sind nicht bekannt.

Mit Gefrierschnitt-Analysen von Ratten-Gehirnen wurden AQP4-Wasserkanäle an Zellmembranen lokalisiert, an denen sich OAPs aus 6 - 7 nm großen Partikeln befinden (Yang et al., 1996). Weil die Partikel in Epithelien und Membranen gefunden wurden, in denen auch das AQP4-Protein vorkam, warf die Frage nach der Koexistenz auf. Versuche mit AQP4-knockout Mäusen, die keine OAP-Aggregate ausbilden konnten, bestätigten die Vermutung, dass die OAP-Aggregate mit dem AQP4-Protein (MIWC) assoziiert sind (Frigeri et al., 1995b; Verbavatz et al., 1997). Zusätzlich wurde durch Immungoldlabelling der AQP4-AK der direkte Zusammenhang zwischen den OAPs und den AQP4-Wasserkanälen an der Zellmembran nachgewiesen (Rash et al., 2004). Die Hypothese, dass am Aufbau dieser orthogonalen Membran-Strukturen AQP4-Isoformen beteiligt sein könnten, wurde durch die Beteiligung der AQP4-Spleißvarianten M1 und M23 am Aufbau der OAPs von Maus-Astrozyten bestätigt (Furman et al., 2003). Es ist allerdings nicht bekannt, ob prinzipiell AQP4-Proteine in unterschiedlichen Gewebetypen in den orthogonalen Partikeln vorkommen, oder ob AQP4-Spleißvarianten, AQP4-Monomere oder AQP4-Tetramere separat bestehen können (Abb. 37 A und B). Bewiesen ist, dass die alleinige Expression der M1-AQP4-Isoform keine stabilen „square arrays“ ausbilden kann (Furman et al., 2003; Silberstein et al., 2004). Die verkürzten AQP4-Spleißvarianten wären aufgrund anderer Faltungseigenschaften in der Lage, auch Molekülstrukturen zu formen, die den OAPs nahe kommen. Möglicherweise wird diese Anord-

nung in anderen AQP4-exprimierenden Geweben - Auge, Magen, Trachea, Darm und vielleicht auch Herz - verwendet. Es ist andererseits nicht bekannt, ob spezifische Faktoren - wie  $\text{Ca}^{2+}$  - oder Zytoskelett-Modulatoren - die Flächengröße oder die Zahl orthogonaler Reihen beeinflussen.

Die Gründe für den Einbau von AQP4 in die orthogonalen Reihen sind bisher unbekannt. Vielleicht lässt sich bei kleinen Membranen mit dieser Partikel-Anordnung mit Hilfe der OAPs für AQP4-Proteine eine maximale Dichte erreichen und dadurch ein effizienter Wassertransport erzielen. Die Einfachkanal-Wasserdurchlässigkeit von AQP4 ist im Vergleich zu anderen Aquaporinen drei- bis viermal höher (Yang and Verkman, 1997; Yang et al., 1997). Die Zusammenlagerung von AQP4 zu OAPs könnte einen höheren Wassertransport ermöglichen und die Entwässerung durch Membranen elegant lösen helfen. Fazit ist: AQP4-Proteine und deren Isoformen sind Bestandteile der OAPs, womit sie die Identität und Funktion der OAPs bestimmen.



**Abb. 37: Elektronenmikroskopische Aufnahmen zu OAPs (Furman et al., 2003)**

Gefrierbruchverätzungen an Kontroll-Zellen von Chinese hamster ovary cells (CHO) und M1 / M23-Isoform exprimierende Maus-Astrozyten.

**A:** P-Face transfizierte CHO-Zellen zeigen 7 - 9 nm grosse Pocken auf ihrer Membran aber keine OAPs.

**B:** E-Face transfizierte CHO-Zellen weisen eine geringere Anzahl der Pocken auf.

**C:** P-Face an M23-exprimierenden Zellen enthüllen drei „square arrays“ (kleine Ovale) und fünf lange „square array“-Verknüpfungen mit 6 nm Abständen.

**D** Immungold-Antikörper Detektion der AQP4-Isoformen in M23-P-Face-Zellen.

**E:** Höhere Auflösung einer E-Face-Anordnung in M23-Zellen.

D zeigt Formaldehyd-fixierte Zellen. Die weiteren Aufnahmen zeigen Glutalaldehyd-fixierte Zellen. Der Maßstab rechts entspricht = 100 nm

P und E-Face unterliegen der internationalen Nomenklatur zur Beschreibung der nach einer Gesamtmembran-Separation vorliegenden Fraktionen (Branton et al., 1975).

P-Face: Beschreibt die protoplasmatische Fraktion, welche im Kontakt zu Zytoplasma, Nukleoplasma oder mitochondrialem Plasma steht.

E-Face: Beschreibt die extraplasmatische Fraktion, welche mit dem extrazellulären Raum, dem extranukleären Raum oder dem extramitochondrialem Raum in Verbindung steht.

#### 4.7 AQP-Knockout-Mäuse

Der AQP-Verlust und die damit verbundenen Prozesse wurden mit Hilfe von knockout-Mäusen (KO-Mäuse) untersucht. AQP4 kommt als permselektiver Wasserkanal ubiquitär vor. Im Gehirn von Säugetieren und in anderen Zelltypen übernimmt AQP4 die Regulation der Serum-Osmolarität (Jung et al., 1994a). In KO-Mäusen wurde nach zerebralen Störungen im Vergleich zu den Kontrolltieren eine zu Ödemen führende Wasserein-

lagerung um 35 % vermindert (Manley et al., 2000). Bei diesen KO-Tieren konnte ein Schutzmechanismus der Nervenzellen nachgewiesen werden welcher dazu beiträgt, die morphologische Integrität zu bewahren. Dabei erfolgte in den Zellen eine kontrollierte Schwellung von definierten Zellbereichen, welche ohne besondere Funktionen sind. So schwellen z.B. bei Glia-Zellen die Astrozyten-Endköpfe mit nachfolgender Störung der Osmolarität (Nielsen et al., 1997b), um das Neuron zu schützen. Vermutlich sind verschiedene elektrolytische Transporter und ein koordinierter Osmolyt Transfer für diese Selektivität innerhalb der Zellen zuständig.

In Lungen von Säugetieren liegen drei verschiedene AQPs vor: AQP1 im mikrovaskulären Epithel, AQP4 im Luftweg-Epithel und AQP5 im alveolären Epithel (Ma et al., 1997). Bei AQP1-Verlust nimmt der transkapilläre Wassertransport als Antwort auf eine hydrostatische Druckdifferenz ab. Der Verlust beeinflusst aber die isomolare alveoläre Flüssigkeits-Absorption nicht. Ein AQP4-Verlust bei KO-Mäusen hat weder auf die Luftraum-Wasser-Permeabilität noch auf die alveoläre Flüssigkeitsresorption einen Einfluss und verursacht auch sonst keine signifikanten Effekte (Bai et al., 1999). Auch der Verlust der OAPs führt lediglich zu einem verminderten Wassertransport (Bordi et al., 1986; Neuhaus, 1990; Yang et al., 1996; Verbavatz et al., 1997; Furman et al., 2003).

Auch die zahlreiche Studien an KO-Mäusen verweisen auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen Wasserkanälen und Osmolarität. Der Einfluss auf die Osmolarität nach AQP1- und AQP4-Verlust war in der Mäuse-Niere (Schnermann et al., 1998) allerdings in Bezug auf die Fähigkeit, Urin zu konzentrieren, nur gering (van Hoek et al., 2000). Diese beiden Wasserkanal-Proteine waren nicht in der Lage, die Konzentration des Urins bei Wasserentzug zu erhöhen (Meyer and Verkman, 1987; Ma et al., 1996a; Chou et al., 1998).

Neben der zentralen Wasserregulation regelt AQP4 auch andere zelluläre Prozesse. Unter physiologischen Bedingungen ist AQP4 z.B. im celliliaren Epithel und in Müller-Zellen der Retina umfangreich exprimiert. Nach Proteinverlust bei Mäusen war die Elektroretinogram-b-Welle signifikant reduziert, jedoch war die Retina morphologisch nicht verändert (Li et al., 2002). Nach AQP4-Verlust bei KO-Mäusen führte der gestörte Druckausgleich zwischen den Hensen-Claudius-Zellen (an der Basallamina des Innenohres) und den sensorischen Haarzellen zu einer verminderten akustischen Signaltransduktion (Verkman, 2000). Auch in der basolateralen Membran der Magenwand von Mäusen und in der humanen Magengrube finden sich AQP4-Proteine (Misaka et al., 1996). Bei KO-Mäusen war die Magenwand nicht verändert, obwohl die Flüssigkeits-

regulierung bei der Säureproduktion schlechter als beim Wildtyp ausfiel (Wang et al., 2000). Nach Aquaporin-Verlust kann an KO-Mäusen eine Störung in unterschiedlichen Organ- und Gewebetypen auftreten, die weder phänotypische noch physische oder morphologische Auswirkungen hatte.

#### **4.8 Das mRNS-AQP4-Transkript**

Im Northern-Blot fand sich in Kaninchen-Kardiomyozyten ein Transkript (5,5 kb), welches etwa die Grösse des humanen AQP4-Protein-Transkriptes hatte (6 kb; Abb. 30). Die Sequenzanalyse für das Kaninchen-AQP4 zeigte eine chromosomale Homologie mit dem humanen AQP4 (hMIWC) Transkript am 18q22 Chromosom. Die Promotergerichteten Primer für die Analyse der Kaninchen-Spleißvarianten lehnten sich an das humane Isoformen-Modell an (Yang et al., 1995). Dabei ergab sich eine 100 %ige Homologie zur amplifizierten Sequenz. Ein funktioneller Zusammenhang für die unterschiedlichen AQP4-Isoformen konnte damit jedoch nicht belegt werden. Neben ubiquitär exprimierten Wasserkanälen sind andere nur in ganz bestimmten Organen zu finden, oder sie werden in bestimmten Organen bevorzugt exprimiert (Abb. 31).

Die AQP4-Isoformen scheinen nicht nur zentrale Aufgaben wie die Wasserregulation zu besitzen (s. 4.7). Die bevorzugte Expression von Aquaporinen in manchen Organen lässt auf ganz bestimmte Aufgaben schliessen (Shiels and Bassnett, 1996; Misaka et al., 1996; Verkman et al., 2000; Wang et al., 2000). Interessant ist auch, dass neben der selektierten Organ-Expression der Aquaporine auch Unterschiede in der Stärke des Expressionsprofils (Umenishi and Verkman, 1998), der Grösse (Ma et al., 1997) und innerhalb der Spezies existieren (Ma et al., 1993; Lu et al., 1996; Ma et al., 1997).

#### **4.9 Zell- und Organschwellung *in vivo***

Akkumulation osmotisch wirksamer Metabolite mit einem osmotischen Gradienten und Zellschwellung sind eine prominente Komponente für einen ischämischen myokardialen Zelltod. Die Reperfusion mit iso-osmotischen Blut nach einer längeren Ischämie lässt die Kardiomyozyten anschwellen und zerstört ihre Membranen irreversibel (Diaz et al., 2003); danach verlieren diese u.a. Dystrophin (Armstrong et al., 2001): Eine osmotisch bedingte Zell-Zerstörung hat stattgefunden (Ganote and Humphrey, 1985).

Oxygenierte Kardiomyozyten können einen osmotischen Wechsel besser tolerieren, denn sie können den Anstieg des Zellvolumens durch einen hypo-osmotischen Wechsel

nach Aktivierung von regulatorischen Volumen-Verringerungs-Mechanismen begrenzen, welche von der Öffnung von Chlorid-Kanälen abhängen (Zhang et al., 1993; Jackson and Strange, 1993). Geschützte, durch Ischämie präkonditionierte Kardiomyozyten verlieren kein Dystrophin. Vielmehr ist die Schwellung im Kardiomyozyten reduziert, was zu einer Kardioprotektion führt (Armstrong et al., 2001). Eine pharmakologische Inhibierung der aktivierten Cl-Kanäle, die die Kardioprotektion durch eine ischämische Präkonditionierung fördern, wirkt an isolierten Kaninchen-Kardiomyozyten und bei Langendorff-perfundierten Herzen dem Zelltod durch Schwellung entgegen (Diaz et al., 1999). Die Blockade der Cl-Kanäle verhindert an isolierten Kaninchen-Kardiomyozyten und bei Puffer-perfundierten Kaninchen-Herzen eine durch pharmakologische Präkonditionierung und in der Folge eine durch Adenosin-A1-Rezeptor-Aktivierung oder eine direkte PKC-Stimulation hervorgerufene Kardioprotektion (Batthish et al., 2002).

Die Wasserregulation über den Cl-Kanal- spielt neben den Wasserkanal-Proteinen eine große Rolle für die Kontrolle des Kardiomyozyten-Volumens und dadurch auch für die Kardioprotektion durch die ischämische Präkonditionierung (Vandenberg et al., 1996). Die Regulierung der Osmolarität über die Wasserkanalproteine ist eine der zentralen Größen zur Ödem-Verminderung und damit zur Organ-Protektion.

Ödeme können unterschiedlich lokalisiert sein. Ein intrazelluläres Ödem erzeugt eine Zell-Degeneration. Andererseits kann sich ein Ödem durch übermäßige Flüssigkeitsansammlung im interstitiellen Gewebe bilden. Bei einer vermehrten Flüssigkeitsansammlung (Transsudat) im Herzbeutel spricht man vom Hydroperikard. Ödeme können lokal oder generalisiert auftreten oder entzündliche oder nicht-entzündliche Komponenten haben.

Physiologischerweise befindet sich die proteinfreie Filtration aus dem arteriellen Schenkel von Kapillaren und die Reabsorption in den venösen Schenkel im Fließgleichgewicht. Ödeme treten immer dann auf, wenn die Filtrationsmenge die Summe aus Resorption und Lymph-Abfluss übersteigt. Die Pathophysiologie der kardialen Ödementstehung wird durch einen erhöhten hydrostatischen Druck vermittelt. Die Folgen daraus können sein:

- Rechtsherzversagen (kongestives Herzversagen),
- konstriktive Perikarditis,
- Pfortaderstau (Ascites).

Ödeme entstehen auch bei einem verminderten kolloidosmotischen Druck (verminderte Plasmaproteinkonzentration = Hypoproteinämie). Neben einer Eiweißmangel-Ernährung

ist der Verlust von Plasmaproteinen durch starken Parasitenbefall (z.B. Trichostrongylus) Ursache eines Ödems.

Wie sich die Ödembildung in der Primärkultur unserer isolierten Kaninchen-Kardio-myozyten verhielt, wurde unter Punkt 4.2 bereits beschrieben. Nach ultrastrukturellen Untersuchungen von humanem Myokard und nach experimentellen Ergebnissen reagierten spezialisierte isolierte Herzmuskelzellen - vor allem des Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystems und der Kapillarendothelien – gegenüber Ischämie / Reperfusion empfindlicher als das Arbeitsmyokard (Schmiedl et al., 1999; Nozawa et al., 2003). Störungen an diesen Zellen begünstigen die Entstehung von Arrhythmien.

## 5. Klinische Bedeutung

Die hohe Wasserpermeabilität von Epithelien der Nierentubuli, Lungenalveolen, Hirnventrikel, des Myokards oder auch der Erythrozyten beruht auf der regulatorischen Kapazität der Aquaporine (AQPs) (Agre and Kozono, 2003). Trotz intensiver Forschung ist die Funktion der Aquaporine nicht geklärt. Doch bereits jetzt ist zu erkennen, dass ein Ausfall der AQPs zu schweren Krankheitsbildern führen kann. Eine Dysfunktion oder ein Fehlen der AQPs führt z.B. zum Katarakt oder zum nephrogenen Diabetes insipidus (King and Agre, 1996) und wird auch für die Entstehung der Herzinsuffizienz diskutiert (Verkman, 2000; Wang et al., 2001b; Suzuki et al., 2002). Daher stellen AQPs attraktive Ziele für Pharmaka dar.

Bei dem sowohl autosomal rezessiven als auch dem dominant nephrogenen Diabetes insipidus kann die Niere nicht auf das antidiuretische Hormon (ADH; Vasopression) reagieren, so dass die Diurese drastisch erhöht ist. Diese Erkrankung wird durch Mutationen am AQP2-Protein hervorgerufen und bildet damit das erste Beispiel für eine dominante Krankheit, die in einem direkten Zusammenhang mit einem Wasserkanal steht. Der mit dem Genotyp verbundene Funktionsverlust behindert den Proteintransport zum Wirkungsort. Eine Dysfunktion des Proteins selbst wurde jedoch nicht bestätigt (Kamsteeg et al., 1999).

Das AQP4-Protein fungiert unter anderem als ein Ventil für Hirnwasser, dessen Überschuss bei einem zerebralem Ödem letale Folgen haben kann (Manley et al., 2000). Zerebrale Ödeme tragen signifikant zu Krankheit und Tod bei allgemeinen neurologischen Defekten bei. Die aktuellen Behandlungsmethoden beschränken sich auf die Gabe von hyperosmolaren Substanzen oder auf eine chirurgische Dekompression. AQP4-Proteine sind nicht selbst für eine Ödembildung zuständig, vielmehr wird durch pathophysiologische-Faktoren die Funktion der Wasserkanalproteine beeinträchtigt und damit die Wasserbalance gestört. AQP4-KO-Mäuse hatten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine schlechtere Überlebenschance gegenüber der bei Ödemen eintretenden Wasser-Intoxikation.

Unsere Versuche ergaben, dass ein zur Zellschwellung führender Wassereinstrom nach pharmakologisch induzierter Ischämie durch die signifikant erhöhte Expression von AQP1-Proteinen vermindert wurde. Die Präkonditionierung der Kardiomyozyten führte zu keiner weiteren Erhöhung der AQP1- und AQP4-Expression. Im Myokard erfolgt bei Zellschwellung eine Koaktivierung von  $K^+$ - und Cl-Kanälen. In den Kardiomyozyten

könnten die Volumen-aktivierten Cl-Kanäle an der Repolarisation und unter pathologischen Bedingungen an der Entstehung von Arrhythmien beteiligt sein (Horner et al., 1994; Vandenberg et al., 1994).

Bei inflammatorischen Prozessen spielt eine Zellschwellung immer eine Rolle. Dadurch wird die Proteinbiosynthese oder die Zellproliferation beeinflusst (Sorota, 1992).

Nach einem Myokardinfarkt - eine häufig gestellte Diagnose - können größere Myokardareale nekrotisch werden. Elektronenmikroskopisch lassen sich Zellödem, definierte Alterationen von Mitochondrien und anderer Organellen sowie Veränderungen des Kontraktionszustandes der Sarkomere nachweisen (Schmiedl et al., 1999). Durch geeignete Inhibitoren und durch spezifische Triggerung von Kanälen könnten Schwellungen unterbunden werden, die an der Ödembildung beteiligt sind. Dabei würden sich Aquaporine als Target-Proteine bestens eignen.

Zahlreiche Fragen zur Regulation und zu strukturellen Eigenschaften von Aquaporinen und deren Isoformen bleiben offen. Die vorliegende Arbeit sollte zur Klärung ausgewählter zellulärer und molekularer Mechanismen bei Kardiomyozyten beitragen. Es sollte auch die Bedeutung von Aquaporinen in der Klinik als mögliche Zukunfts-Targets angesprochen werden (Hanley et al., 2002). Es wäre nämlich sinnvoll, Moleküle zu konstruieren, die den Wasserfluss durch Aquaporine regulieren und somit den Wassereinstrom in die Zelle blockieren können. Derartige Moleküle wären zunächst in der Simulation und später im Versuchstier zu testen. Die genauen Kenntnisse über solche Wasserkanal-regulierenden Substanzen würden vielversprechende Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Medikamente liefern.

## 6. Zusammenfassung

Die zelluläre Wasseraufnahme und -abgabe ist ein wichtiges Regulativ intrazellulärer metabolischer Prozesse. Darin ist eine Vielzahl von Proteinen involviert, zu denen auch die Wasserkanalproteine gehören (Aquaporine; AQPs).

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, im Hinblick auf koronare Herzkrankheiten einen therapeutischen Ansatz zur Vermeidung ischämischer Schädigungen und damit von irreversiblen Wasserintoxikationen und zellulären Ausfällen am Beispiel der Wasserkanalproteine AQP1 und AQP4 zu untersuchen. Deren Verhalten unter veränderten metabolischen Bedingungen wurde experimentell an isolierten Zellen des Kaninchens überprüft.

Zu den sechs Versuchsschritten gehörte erstens die Isolierung und Kultivierung geeigneter Kaninchen-Kardiomyozyten nach Perfusion des Myokards mit einem Kollagenasehaltigen-Puffer. Die Molekülgröße von AQP1 und AQP4 wurde bestimmt. Sie betrug 23 kDa bzw. 45 kDa. In der zweiten Versuchsreihe zeigte sich anhand zellulärer und morphologischer Parameter, dass die erworbene  $\text{Ca}^{2+}$ -Toleranz der isolierten Kaninchen-Kardiomyozyten die Funktionalität und Lebensdauer der isolierten Zellen gegenüber pharmakologischen Interventionen steigern kann. Die morphologischen und mikroskopischen Untersuchungen ergaben dennoch eine schädliche Wirkung auf die Zellorganellen, die vermutlich durch freie Radikale (Uyama et al., 1992) hervorgerufen wurden. Dadurch war nur eine unbefriedigende Eignung zur Kultivierung als Primärkultur ermittelt worden.

Der dritte Schritt war pathophysiologisch orientiert: An isolierten Kardiomyozyten wurde eine pharmakologische Ischämie durch Inhibierung des Zellstoffwechsels induziert. Durch vorheriges Öffnen der  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanäle wurde eine protektive Wirkung in den Kardiomyozyten erzielt. Durch den gleichzeitigen Antagonismus mit  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanal-Blockern sollte der Zusammenhang zwischen der AQP-Expression und dem veränderten Zellstoffwechsel festgestellt werden. Dabei wurden Unterschiede zwischen der Expression der untersuchten Aquaporine und den ventrikulären Zellaufschlüssen deutlich. Bei Inhibierung des Zellstoffwechsels trat eine signifikante Erhöhung der AQP1-Protein-Expression auf, während bei Protektion der Zellen die Expression bei einer anschließenden Inhibierung stabil blieb. Diese Eigenschaft wurde in linksventrikulären Zellaufschlüssen an mikrosomalen Zellmembranen deutlich.

Im vierten Versuchsschritt war nach Proteinkinase-C-Aktivierung mit einem Phorbol ester die Expression der AQP4-Proteine sowohl an den isolierten Zellen der linksventrikulären

als auch der rechtsventrikulären Aufschlüsse signifikant erhöht. Dabei übernahm der Phorbol ester eine zelluläre protektive Funktion durch das Phosphorylieren der  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanäle (Liu et al., 1996; Wang et al., 2001c). Fünftens: AQP4-Expressionen unterschieden sich dadurch, dass eine von der AQP1-Expression differenzierte Signaltransduktion beider Wasserkanal-Proteine ermittelt werden konnte. Bei PKC-Aktivierung wurde eine signifikante Erniedrigung der AQP1-Protein Expression gegenüber Kontrolle deutlich. Einen Zusammenhang bezüglich einer Translokation der beiden beteiligten Aquaporine konnte am Kaninchenmyokard nicht festgestellt werden. AQP1 und AQP4 waren ausschließlich auf intrazellulären mikrosomalen Membranen lokalisiert. Anders verhält es sich in humanen Aufschlüssen, bei welchen AQP1 in der Plasmamembran und AQP4 in den mikrosomalen Membranen identifiziert wurde. Damit wäre eine Translokation des intrazellulären mikrosomalen Vesikelpools zur Plasmamembran beider Aquaporine - ausgelöst durch humorale oder inflammatorische Prozesse - bei humanen Kardiomyozyten denkbar.

Im sechsten Schritt wurden mit Primer-gerichteten Transkriptionsprofilen homologe Bereiche humaner und Kaninchen-Gene ermittelt. Die Sequenzanalyse beider Spezies ergab eine Homologie der AQP4-Isoformen. Neuere Studien der molekularen Regulation und Anordnung der Struktur von AQP4 beschreiben eine differentielle Regulation der verschiedenen AQP4-Isoformen (Verbavatz et al., 1997; Furman et al., 2003; Silberstein et al., 2004). Diese Isoformen werden offenbar durch unterschiedliche Signalmechanismen kontrolliert. Die genauen Translations-Mechanismen, welche an der Regulation der gewebetypischen AQP4-Isoformen partizipieren, sind zurzeit noch unklar. Zusätzlich wurde mit Hilfe RNS-spezifischer Sonden des AQP4-Proteins erstmalig die Größe des Expressionsprofils (5,5 kb) beim Kaninchen bestimmt.

## 7. Anhang

### Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturmodell von AQP1 .....	3
Abb. 2: Modifizierte Versuchsgruppen für den Zellaufschluss.....	22
Abb. 3: Versuchsanordnung und Verlauf für den zellulären Proteinkinase-Aufschluss ..	24
Abb. 4: Lichtoptische Übersicht eines Kardiomyozyten nach dem letzten Waschvorgang.....	41
Abb. 5: Konfokale Laser-Scan-Aufnahmen isolierter Kardiomyozyten .....	42
Abb. 6: Einfluss von Kalzium und Temperatur auf die Vitalität isolierter Myozyten .....	43
Abb. 7: Intakter Kardiomyozyt unter Kontrollbedingungen .....	44
Abb. 8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen isolierter Kardiomyozyten.....	45
Abb. 9: Nachweis der Ouabain-sensitiven Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase .....	47
Abb. 10: Expressions von AQP1 in der mikrosomalen Membran, Beispielblot.....	48
Abb. 11: Mikrosomale-Membran-Fractionen auf AQP1 .....	49
Abb. 12: Ventrikelaufschlüsse in Hinblick auf die AQP1-Protein-Expression .....	49
Abb. 13: Humane subzelluläre Fraktionierung .....	51
Abb. 14: Anti-AQP4 Expressions-Signale bei Kaninchen-Kardiomyozyten .....	52
Abb. 15: Rohmembran-Fractionen auf Anti-AQP4 .....	53
Abb. 16: Ventrikelaufschlüsse in Hinblick auf die AQP4-Protein-Expression .....	53
Abb. 17: Humane subzelluläre Fraktionierung auf anti-AQP4-AK .....	54
Abb. 18: Charakterisierung der AQP1-Expression in Kaninchen-Kardiomyozyten.....	55
Abb. 19: AQP1-Protein-Expression nach PKC-Protokoll Aufschluss .....	55
Abb. 20: Charakterisierung der AQP4-Expression .....	56
Abb. 21: AQP4-Protein-Expression nach PKC-Protokoll Aufschluss .....	56
Abb. 22: RNS Reinheitskontrolle nach gelelektrophoretischer Auftrennung.....	57
Abb. 23: Housekeeping-Gene bei Kaninchen und humanem Myokard .....	60
Abb. 24: Auswahl einiger PCR-Proben zur hMIWC-Fragment-Detektion.....	61
Abb. 25: Auswahl einiger PCR-Proben zur B1/C1-Fragment-Detektion.....	62
Abb. 26: Repräsentative PCR-Proben zur A1/A2- und A1/C1-Fragment-Detektion .....	62
Abb. 27: Übersicht amplifizierter humaner und Kaninchen-PCR-Fragmente .....	63
Abb. 28: Isoformen-Amplifikationen in humanem Gewebe.....	64
Abb. 29: Restriktionsanalyse identifizierter Klone .....	65

Abb. 30: Northern Blot Proben-Auftragung.....	73
Abb. 31: Gewebe-spezifische Detektion des AQP4-Transkripts bei humanen Proben ..	74
Abb. 32: Pathophysiologie des Ischämie-Reperfusionsschadens am Myokard .....	78
Abb. 33: Modell zum Versuchsaufbau und Wirkungsmechanismus der pharmakologischen Induktionen an isolierten Kardiomyozyten.....	82
Abb. 34: Genomische Struktur des hMIWC .....	87
Abb. 35: Humanes AQP4-Gen .....	88
Abb. 36: Primer-gerichtete Promotoren Ableseraster.....	89
Abb. 37: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von OAPs .....	94

### **Tabellenverzeichnis**

Tab. 1: Primertabelle	12
Tab. 2: Gelzusammensetzungen	16
Tab. 3: PCR-Primer	58
Tab. 4: Dokumentierte und ermittelte Fragment-Größen	63

## Abkürzungen

<b>5HD</b>	5-Hydroxydecanoat
<b>A</b>	Aqua
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AK</b>	Antikörper
<b>AP</b>	alkalische Phosphatase
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>AQP</b>	Aquaporin
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>ATP</b>	Adenosin-5'-Triphosphat
<b>BCA</b>	Bicinchoninat
<b>bidest.</b>	doppelt destilliert (Reinstwasser)
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BPB</b>	Bromphenolblau
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin
<b>ca.</b>	circa
<b>cDNS</b>	komplementäre Desoxiribonukleinsäure
<b>cfu</b>	Colony forming units
<b>CH<sub>3</sub> COOH</b>	Essigsäure
<b>DAB</b>	3,3-Diaminobenzidin
<b>DIG</b>	Digoxygenin
<b>DNase</b>	Desoxiribonuklease
<b>DMF</b>	Dimethylformamid
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNS</b>	Desoxyribonucleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>Dz</b>	Diazoxid
<b>ECL</b>	Verstärkte Chemilumineszenz
<b>E. coli</b>	Escherichia coli
<b>EDTA</b>	Ethylen-Diamin-Tetraacetat Dinatriumsalz
<b>EGTA</b>	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N4tetraacetat

<b>EtBr</b>	Ethidiumbromid
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>F-Actin</b>	Filamentöses Actin
<b>FCS</b>	Fötale Kälberserum (auch Rinderserum)
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>G-Actin</b>	Globuläres Actin
<b>GAP</b>	GTPase aktivierendes Protein
<b>GLUT</b>	Glucosetransporter
<b>GTP</b>	Guanosin-5'-triphosphat
<b>GTPase</b>	Guanosin-5'-triphosphatase
<b>h</b>	Stunde
<b>HEPES</b>	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-N-2-ethansulfonsäure
<b>HRP</b>	Horse Radish Peroxidase
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>i.m.</b>	intramuskulär
<b>IP</b>	Immunopräzipitation
<b>IPTG</b>	Isopropyl-(D- thigalactopyranosid)
<b>i.v.</b>	intravenös
<b>KaAc</b>	Kaliumacetat
<b>Kan</b>	Kanamycin
<b>kb</b>	Kilobasen
<b>kDa oder kD</b>	Kilo Dalton
<b>LB-Medium</b>	Luria-Bertani-Medium
<b>MCS</b>	Multi Cloning Side
<b>MeOH</b>	Methanol
<b>Medium 199</b>	Modifiziertes Early Salz Kulturmedium
<b>MOPS</b>	3-(N-Morpholin)-propansulfonsäure
<b>N</b>	???
<b>NaAc</b>	Natriumacetat
<b>NaCN</b>	Natriumcyanid
<b>NaF</b>	Natriumfluorid
<b>NP-40</b>	Nonidet-P40 (Trigetol)
<b>OD</b>	optical density
<b>OT</b>	Objekträger

<b>p.a.</b>	pro Analysis
<b>P oder PD</b>	Prodomäne
<b>PAA</b>	Polyacrylamid
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
<b>PBST</b>	Phosphat/Tween-gepufferte Kochsalzlösung
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>PKB</b>	Proteinkinase B (= Akt)
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>PKC-I</b>	Proteinkinase C-Fragment Inhibitor
<b>PMA</b>	Phorbol-12- Myristat-3-Acetat
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<b>PVDF</b>	Polyvinylidifluorid
<b>RIPA</b>	Radioimmunpräzipitationsassay
<b>RNS</b>	Ribonukleinsäure
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>upm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>TAE</b>	Tris-Acetat EDTA
<b>TBS</b>	Tris/Bohrat-gepufferte Kochsalzlösung
<b>TBST</b>	Tris/Bohrat/Tween-gepufferte Kochsalzlösung
<b>TEMED</b>	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
<b>TPA</b>	Tris/HCl-Phosphat-Puffer
<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
<b>Triton X-100</b>	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
<b>Tween 20</b>	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
<b>U</b>	Unit / Einheit
<b>ÜN</b>	über Nacht
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>vol</b>	Volumen
<b>v/v</b>	Volumen pro Volumen
<b>w/v</b>	Gewicht pro Volumen
<b>X-Gal</b>	5-Chloro-4-bromo-3-indolyl-D-galactopyranosid

## 8. Literatur

1. Agre,P., L.S.King, M.Yasui, W.B.Guggino, O.P.Ottersen, Y.Fujiyoshi, A.Engel, and S.Nielsen, 2002, Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine, *J.Physiol* 542, 3-16.
2. Agre,P. and D.Kozono, 2003, Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases, *FEBS Lett.* 555, 72-78.
3. Agre,P., J.C.Mathai, B.L.Smith, and G.M.Preston, 1999, Functional analyses of aquaporin water channel proteins, *Methods Enzymol.* 294, 550-572.
4. Agre,P., G.M.Preston, B.L.Smith, J.S.Jung, S.Raina, C.Moon, W.B.Guggino, and S.Nielsen, 1993, Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel, *Am.J.Physiol* 265, F463-F476.
5. Alberts,P., D.Bray, J.Lewis, M.Raff, K.Roberts, and J.D.Watson, 1995, *Molekularbiologie der Zelle* VCH-Verlag.
6. Altschuld,R., L.Gibb, A.Ansel, C.Hohl, and G.P.and Brierley, 1982, Calcium tolerance of isolated rat heart cells, *J Moll Cell Cardiol* 12, 1383-1395.
7. Ambrosio,G., I.Tritto, and M.Chiariello, 1995, The role of oxygen free radicals in preconditioning, *J Mol.Cell Cardiol* 27, 1035-1039.
8. Amiry-Moghaddam,M., T.Otsuka, P.D.Hurn, R.J.Traystman, F.M.Haug, S.C.Froehner, M.E.Adams, J.D.Neely, P.Agre, O.P.Ottersen, and A.Bhardwaj, 2003, An alpha-syntrophin-dependent pool of AQP4 in astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100, 2106-2111.
9. Armstrong,S. and C.E.Ganote, 1995, In vitro ischaemic preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes: effects of selective adenosine receptor blockade and calphostin C, *Cardiovasc.Res.* 29, 647-652.
10. Armstrong,S.C., C.A.Latham, C.L.Shivell, and C.E.Ganote, 2001, Ischemic loss of sarcolemmal dystrophin and spectrin: correlation with myocardial injury, *J Mol.Cell Cardiol* 33, 1165-1179.
11. Asano,G., E.Takashi, T.Ishiwata, M.Onda, M.Yokoyama, Z.Naito, M.Ashraf, and Y.Sugisaki, 2003, Pathogenesis and protection of ischemia and reperfusion injury in myocardium, *J.Nippon Med.Sch* 70, 384-392.
12. Ashcroft,F.M., 1988, Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels, *Annu.Rev.Neurosci.* 11, 97-118.
13. Ashcroft,F.M., S.J.Ashcroft, and D.E.Harrison, 1988, Properties of single potassium channels modulated by glucose in rat pancreatic beta-cells, *J.Physiol* 400, 501-527.

14. Auchampach, J.A. and G.J. Gross, 1993, Adenosine A1 receptors, KATP channels, and ischemic preconditioning in dogs, *Am.J Physiol* 264, H1327-H1336.
15. Bai, C., N. Fukuda, Y. Song, T. Ma, M.A. Matthay, and A.S. Verkman, 1999, Lung fluid transport in aquaporin-1 and aquaporin-4 knockout mice, *J.Clin. Invest* 103, 555-561.
16. Baines, C.P., G.S. Liu, M. Birincioglu, S.D. Critz, M.V. Cohen, and J.M. Downey, 1999, Ischemic preconditioning depends on interaction between mitochondrial KATP channels and actin cytoskeleton, *Am.J Physiol* 276, H1361-H1368.
17. Baki, L. and M.N. Alexis, 1994, The efficiency of nuclear processing of the tyrosine aminotransferase mRNA transcript increases after partial hepatectomy, *Eur.J Biochem.* 225, 797-803.
18. Banderali, U. and G. Roy, 1992, Activation of K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in MDCK cells during volume regulation in hypotonic media, *J.Membr.Biol.* 126, 219-234.
19. Barancik, M., P. Htun, C. Strohm, S. Kilian, and W. Schaper, 2000, Inhibition of the cardiac p38-MAPK pathway by SB203580 delays ischemic cell death, *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 35, 474-483.
20. Batthish, M., R.J. Diaz, H.P. Zeng, P.H. Backx, and G.J. Wilson, 2002, Pharmacological preconditioning in rabbit myocardium is blocked by chloride channel inhibition, *Cardiovasc.Res.* 55, 660-671.
21. Bernstein, P. and J. Ross, 1989, Poly(A), poly(A) binding protein and the regulation of mRNA stability, *Trends Biochem.Sci.* 14, 373-377.
22. Berry, M.N., D.S. Friend, and J. Scheuer, 1970, Morphology and metabolism of intact muscle cells isolated from adult rat heart, *Circ.Res.* 26, 679-687.
23. Birkenkamp-Demtröder, K., S. Bongartz, Ch. Kupfer, M. Schmitt, E. Gams, and J.D. Schipke, 2003, Expression of Water Channels in the Human Heart, *J Clin Basic Cardiol* 6, 77-79.
24. Birnboim, H.C. and J. Doly, 1979, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
25. Blom, N., S. Gammeltoft, and S. Brunak, 1999, Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites, *J Mol.Biol.* 294, 1351-1362.
26. Bordi, C., M. Amherdt, and A. Perrelet, 1986, Orthogonal arrays of particles in the gastric parietal cell of the rat: differences between superficial and basal cells in the gland and after pentagastrin or metiamide treatment, *Anat.Rec.* 215, 28-34.
27. Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal.Biochem.* 72, 248-254.
28. Branton, D., S. Bullivant, N.B. Gilula, M.J. Karnovsky, H. Moor, K. Muhlethaler, D.H. Northcote, L. Packer, B. Satir, P. Satir, V. Speth, L.A. Staehlin, R.L. Steere, and R.S. Weinstein, 1975, Freeze-etching nomenclature, *Science* 190, 54-56.

29. Brewster, J.L., T. de Valoir, N.D. Dwyer, E. Winter, and M.C. Gustin, 1993, An osmosensing signal transduction pathway in yeast, *Science* 259, 1760-1763.
30. Burghardt, B., M.L. Elkaer, T.H. Kwon, G.Z. Racz, G. Varga, M.C. Steward, and S. Nielsen, 2003, Distribution of aquaporin water channels AQP1 and AQP5 in the ductal system of the human pancreas, *Gut* 52, 1008-1016.
31. Calvo Sanchez, D., Gams, E., Schmitz-Spanke, S., and Schipke, J. D. Expression of Water Channel Proteins in the Mammalian Myocardium in the presence of a Mitochondrial ATP-dependent Potassium Channel Opener (Diazoxide). *Archives of Pharmacology* 369[1]. 9-3-2004.  
Ref Type: Abstract
32. Carre, F., F. Rannou, B.C. Sainte, B. Chevalier, J.M. Moalic, B. Swynghedauw, and D. Charlemagne, 1993, Arrhythmogenicity of the hypertrophied and senescent heart and relationship to membrane proteins involved in the altered calcium handling, *Cardiovasc. Res.* 27, 1784-1789.
33. Chien, K.R., K.U. Knowlton, H. Zhu, and S. Chien, 1991, Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response, *FASEB J.* 5, 3037-3046.
34. Chomczynski, P. and N. Sacchi, 1987, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
35. Chou, C.L., T. Ma, B. Yang, M.A. Knepper, and A.S. Verkman, 1998, Fourfold reduction of water permeability in inner medullary collecting duct of aquaporin-4 knockout mice, *Am. J. Physiol* 274, C549-C554.
36. Chou, W.H. and R.O. Messing, 2005, Protein Kinase C Isozymes in Stroke, *Trends Cardiovasc. Med.* 15, 47-51.
37. Clark, M.G., B.J. Gannon, N. Bodkin, G.S. Patten, and M.N. Berry, 1978, An improved procedure for the high-yield preparation of intact beating heart cells from the adult rat biochemical and morphologic study, *J. Mol. Cell Cardiol.* 10, 1101-1121.
38. Cochrane, J., B.T. Williams, A. Banerjee, A.H. Harken, T.J. Burke, C.B. Cairns, and J.I. Shapiro, 1999, Ischemic preconditioning attenuates functional, metabolic, and morphologic injury from ischemic acute renal failure in the rat, *Ren Fail.* 21, 135-145.
39. Cohen, P., 2000, The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update, *Trends Biochem. Sci.* 25, 596-601.
40. Connolly, D.L., C.M. Shanahan, and P.L. Weissberg, 1998, The aquaporins. A family of water channel proteins, *Int J Biochem Cell Biol* 30, 169-172.
41. Crompton, M. and A. Costi, 1988, Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca<sup>2+</sup>, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca<sup>2+</sup> overload, *Eur. J. Biochem.* 178, 489-501.

42. D'Herde,K., B.De Prest, S.Mussche, P.Schotte, R.Beyaert, R.V.Coster, and F.Roels, 2000, Ultrastructural localization of cytochrome c in apoptosis demonstrates mitochondrial heterogeneity, *Cell Death.Differ.* 7, 331-337.
43. Das,B. and C.Sarkar, 2003, Cardiomyocyte mitochondrial KATP channels participate in the antiarrhythmic and antiinfarct effects of KATP activators during ischemia and reperfusion in an intact anesthetized rabbit model, *Pol.J Pharmacol.* 55, 771-786.
44. de Groot,B.L., A.Engel, and H.Grubmuller, 2001, A refined structure of human aquaporin-1, *FEBS Lett.* 504, 206-211.
45. de Weille,J.R., M.Fosset, C.Mourre, H.Schmid-Antomarchi, H.Bernardi, and M.Lazdunski, 1989a, Pharmacology and regulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels, *Pflugers Arch.* 414 Suppl 1, S80-S87.
46. de Weille,J.R., H.Schmid-Antomarchi, M.Fosset, and M.Lazdunski, 1989b, Regulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in insulinoma cells: activation by somatostatin and protein kinase C and the role of cAMP, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86, 2971-2975.
47. Deussen,A. and J.B.Bassingthwaighte, 1996, Modeling [15O]oxygen tracer data for estimating oxygen consumption, *Am.J.Physiol* 270, H1115-H1130.
48. Di Lisa,F. and P.Bernardi, 1998, Mitochondrial function as a determinant of recovery or death in cell response to injury, *Mol.Cell Biochem.* 184, 379-391.
49. Di Lisa,F., R.Menabo, M.Canton, and V.Petronilli, 1998, The role of mitochondria in the salvage and the injury of the ischemic myocardium, *Biochim.Biophys.Acta* 1366, 69-78.
50. Diaz,R.J., S.C.Armstrong, M.Batthish, P.H.Backx, C.E.Ganote, and G.J.Wilson, 2003, Enhanced cell volume regulation: a key protective mechanism of ischemic preconditioning in rabbit ventricular myocytes, *J Mol.Cell Cardiol* 35, 45-58.
51. Diaz,R.J., V.A.Losito, G.D.Mao, M.K.Ford, P.H.Backx, and G.J.Wilson, 1999, Chloride channel inhibition blocks the protection of ischemic preconditioning and hypo-osmotic stress in rabbit ventricular myocardium, *Circ.Res.* 84, 763-775.
52. Dispersyn,G.D. and M.Borgers, 2001, Apoptosis in the heart: about programmed cell death and survival, *News Physiol Sci.* 16, 41-47.
53. Dispersyn,G.D., E.Geuens, D.L.Ver, F.C.Ramaekers, and M.Borgers, 2001, Adult rabbit cardiomyocytes undergo hibernation-like dedifferentiation when co-cultured with cardiac fibroblasts, *Cardiovasc Res* 51, 230-240.
54. Dow,J.W., N.G.Harding, and T.Powell, 1981, Isolated cardiac myocytes. I. Preparation of adult myocytes and their homology with the intact tissue, *Cardiovasc. Res.* 15, 483-514.
55. Downey,J.M., 2004, The cellular mechanisms of ischemic and pharmacological preconditioning, *Cardiovasc.J S.Afr.* 15, S3.

56. Droillard, M.J., S. Thibivilliers, A.C. Cazale, H. Barbier-Brygoo, and C. Lauriere, 2000, Protein kinases induced by osmotic stresses and elicitor molecules in tobacco cell suspensions: two crossroad MAP kinases and one osmoregulation-specific protein kinase, *FEBS Lett.* 474, 217-222.
57. Dunne, M.J., 1994, Phorbol myristate acetate and ATP-sensitive potassium channels in insulin-secreting cells, *Am. J. Physiol* 267, C501-C506.
58. Echevarria, M., E. Gonzalez, A. Gutierrez, and G. Whittembury, 1994a, Water and urea diffusive permeabilities in isolated proximal tubule cells, *Am. J. Physiol* 267, F709-F715.
59. Echevarria, M., E.E. Windhager, S.S. Tate, and G. Frindt, 1994b, Cloning and expression of AQP3, a water channel from the medullary collecting duct of rat kidney, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91, 10997-11001.
60. Eckel, J. and H. Reinauer, 1983, Insulin action on cardiac glucose transport. Studies on the role of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump, *Biochim. Biophys Acta* 736, 119-124.
61. Frigeri, A., M.A. Gropper, C.W. Turck, and A.S. Verkman, 1995a, Immunolocalization of the mercurial-insensitive water channel and glycerol intrinsic protein in epithelial cell plasma membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92, 4328-4331.
62. Frigeri, A., M.A. Gropper, F. Umenishi, M. Kawashima, D. Brown, and A.S. Verkman, 1995b, Localization of MIWC and GLIP water channel homologs in neuro-muscular, epithelial and glandular tissues, *J. Cell Sci.* 108 ( Pt 9), 2993-3002.
63. Fuller, W., P. Eaton, R.A. Medina, J. Bell, and M.J. Shattock, 2001, Differential centrifugation separates cardiac sarcolemmal and endosomal membranes from Langendorff-perfused rat hearts, *Anal Biochem* 293, 216-223.
64. Furman, C.S., D.A. Gorelick-Feldman, K.G. Davidson, T. Yasumura, J.D. Neely, P. Agre, and J.E. Rash, 2003, Aquaporin-4 square array assembly: opposing actions of M1 and M23 isoforms, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100, 13609-13614.
65. Ganote, C.E. and S.M. Humphrey, 1985, Effects of anoxic or oxygenated reperfusion in globally ischemic, isovolumic, perfused rat hearts, *Am. J. Pathol.* 120, 129-145.
66. Gassen H.G. and Schrimpf G., 1999, *Gentechnische Methoden* (Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg).
67. Gerrits, P.M., A.L. Olson, and J.E. Pessin, 1993, Regulation of the GLUT4/muscle-fat glucose transporter mRNA in adipose tissue of insulin-deficient diabetic rats, *J. Biol. Chem.* 268, 640-644.
68. Gorin, E. and H.M. Goodman, 1985, Turnover of growth hormone receptors in rat adipocytes, *Endocrinology* 116, 1796-1805.
69. Gross, G.J. and J.A. Auchampach, 1992, Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs, *Circ. Res.* 70, 223-233.

70. Grover,G.J., P.G.Sleph, and S.Dzwonczyk, 1992, Role of myocardial ATP-sensitive potassium channels in mediating preconditioning in the dog heart and their possible interaction with adenosine A1-receptors, *Circulation* 86, 1310-1316.
71. Grover,G.J., P.G.Sleph, and S.Dzwonczyk, 1990, Pharmacologic profile of cromakalim in the treatment of myocardial ischemia in isolated rat hearts and anesthetized dogs, *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 16, 853-864.
72. Haddad,J., M.L.Decker, L.C.Hsieh, M.Lesch, A.M.Samarel, and R.S.Decker, 1988, Attachment and maintenance of adult rabbit cardiac myocytes in primary cell culture, *Am.J.Physiol* 255, C19-C27.
73. Han,Z., M.B.Wax, and R.V.Patil, 1998, Regulation of aquaporin-4 water channels by phorbol ester-dependent protein phosphorylation, *J Biol.Chem.* 273, 6001-6004.
74. Hanahan,D., 1983, Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J.Mol.Biol.* 166, 557-580.
75. Hanley,P.J., M.Mickel, M.Loffler, U.Brandt, and J.Daut, 2002, K(ATP) channel-independent targets of diazoxide and 5-hydroxydecanoate in the heart, *J Physiol* 542, 735-741.
76. Harvey,J., S.F.Parsons, D.J.Anstee, and B.A.Bradley, 1988, Evidence for the occurrence of human erythrocyte membrane sialoglycoproteins in human kidney endothelial cells, *Vox Sang.* 55, 104-108.
77. Hasegawa,H., S.C.Lian, W.E.Finkbeiner, and A.S.Verkmán, 1994a, Extrarenal tissue distribution of CHIP28 water channels by in situ hybridization and antibody staining, *Am.J.Physiol* 266, C893-C903.
78. Hasegawa,H., T.Ma, W.Skach, M.A.Matthay, and A.S.Verkmán, 1994b, Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues, *J.Biol.Chem.* 269, 5497-5500.
79. Hashiramoto,M. and D.E.James, 2000, Characterization of insulin-responsive GLUT4 storage vesicles isolated from 3T3-L1 adipocytes, *Mol.Cell Biol.* 20, 416-427.
80. Haworth,R.A., D.R.Hunter, and H.A.Berkoff, 1982, Mechanism of Ca<sup>2+</sup> resistance in adult heart cells isolated with trypsin plus Ca<sup>2+</sup>, *J.Mol.Cell Cardiol.* 14, 523-530.
81. Hellstrom,M., H.Gerhardt, M.Kalen, X.Li, U.Eriksson, H.Wolburg, and C.Betsholtz, 2001, Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis, *J.Cell Biol.* 153, 543-553.
82. Horner,S.M., M.J.Lab, C.F.Murphy, D.J.Dick, B.Zhou, and F.G.Harrison, 1994, Mechanically induced changes in action potential duration and left ventricular segment length in acute regional ischaemia in the in situ porcine heart, *Cardiovasc.Res.* 28, 528-534.
83. Hu,K., D.Duan, G.R.Li, and S.Nattel, 1996, Protein kinase C activates ATP-sensitive K<sup>+</sup> current in human and rabbit ventricular myocytes, *Circ.Res.* 78, 492-498.

84. Hu, K., G.R.Li, and S.Nattel, 1999, Adenosine-induced activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in excised membrane patches is mediated by PKC, *Am.J.Physiol* 276, H488-H495.
85. Ikeda, M., E.Beitz, D.Kozono, W.B.Guggino, P.Agre, and M.Yasui, 2002, Characterization of aquaporin-6 as a nitrate channel in mammalian cells. Requirement of pore-lining residue threonine 63, *J Biol.Chem.* 277, 39873-39879.
86. Jackson, P.S. and K.Strange, 1993, Volume-sensitive anion channels mediate swelling-activated inositol and taurine efflux, *Am.J.Physiol* 265, C1489-C1500.
87. Jacobson, J. and M.R.Duchen, 2004, Interplay between mitochondria and cellular calcium signalling, *Mol Cell Biochem* 256-257, 209-218.
88. Jansen, M. and A.Blume, 1995, A comparative study of diffusive and osmotic water permeation across bilayers composed of phospholipids with different head groups and fatty acyl chains, *Biophys.J.* 68, 997-1008.
89. Jennings, R.B., C.E.Murry, and K.A.Reimer, 1991, Energy metabolism in preconditioned and control myocardium: effect of total ischemia, *J.Mol.Cell Cardiol.* 23, 1449-1458.
90. Jones, L.R., S.W.Maddock, and H.R.Besch, Jr., 1980, Unmasking effect of alamethicin on the (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase, beta-adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase, and cAMP-dependent protein kinase activities of cardiac sarcolemmal vesicles, *J.Biol.Chem.* 255, 9971-9980.
91. Jung, J.S., R.V.Bhat, G.M.Preston, W.B.Guggino, J.M.Baraban, and P.Agre, 1994a, Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 13052-13056.
92. Jung, J.S., G.M.Preston, B.L.Smith, W.B.Guggino, and P.Agre, 1994b, Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model, *J.Biol.Chem.* 269, 14648-14654.
93. Kamsteeg, E.J., T.A.Wormhoudt, J.P.Rijss, C.H.van Os, and P.M.Deen, 1999, An impaired routing of wild-type aquaporin-2 after tetramerization with an aquaporin-2 mutant explains dominant nephrogenic diabetes insipidus, *EMBO J* 18, 2394-2400.
94. Kane, C., R.M.Shepherd, P.E.Squires, P.R.Johnson, R.F.James, P.J.Milla, A.Aynsley-Green, K.J.Lindley, and M.J.Dunne, 1996, Loss of functional KATP channels in pancreatic beta-cells causes persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy, *Nat.Med.* 2, 1344-1347.

95. Katsura, T., J.M. Verbavatz, J. Farinas, T. Ma, D.A. Ausiello, A.S. Verkman, and D. Brown, 1995, Constitutive and regulated membrane expression of aquaporin 1 and aquaporin 2 water channels in stably transfected LLC-PK1 epithelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92, 7212-7216.
96. Kelso, E.J., B.J. McDermott, B. Silke, and J.P. Spiers, 2000, Endothelin(A) receptor subtype mediates endothelin-induced contractility in left ventricular cardiomyocytes isolated from rabbit myocardium, *J Pharmacol Exp Ther* 294, 1047-1052.
97. King, L.S. and P. Agre, 1996, Pathophysiology of the aquaporin water channels, *Annu. Rev. Physiol* 58, 619-648.
98. King, L.S., S. Nielsen, and P. Agre, 1996, Aquaporin-1 water channel protein in lung: ontogeny, steroid-induced expression, and distribution in rat, *J. Clin. Invest* 97, 2183-2191.
99. King, R.B., J.B. Bassingthwaite, J.R. Hales, and L.B. Rowell, 1985, Stability of heterogeneity of myocardial blood flow in normal awake baboons, *Circ. Res.* 57, 285-295.
100. Kirsch, G.E., J. Codina, L. Birnbaumer, and A.M. Brown, 1990, Coupling of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels to A1 receptors by G proteins in rat ventricular myocytes, *Am. J Physiol* 259, H820-H826.
101. Koehler, T., D. Laßner, A.-K. Rost, S. Leiblein, and H. and Remke, 1995, Quantitation of mRNA by polymerase chain-reaction - Nonradioactive PCR-methods. (Springer Verlag Heidelberg).
102. Kolter, T., I. Uphues, A. Wichelhaus, H. Reinauer, and J. Eckel, 1992, Contraction-induced translocation of the glucose transporter Glut4 in isolated ventricular cardiomyocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 1207-1214.
103. Krebs, E.G. and J.A. Beavo, 1979, Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes, *Annu. Rev. Biochem.* 48, 923-959.
104. Krenz, M., O. Oldenburg, H. Wimpee, M.V. Cohen, K.D. Garlid, S.D. Critz, J.M. Downey, and J.N. Benoit, 2002, Opening of ATP-sensitive potassium channels causes generation of free radicals in vascular smooth muscle cells, *Basic Res. Cardiol* 97, 365-373.
105. Kurkinen, K., R. Busto, G. Goldsteins, J. Koistinaho, and M.A. Perez-Pinzon, 2001, Isoform-specific membrane translocation of protein kinase C after ischemic preconditioning, *Neurochem. Res.* 26, 1139-1144.
106. Kurth-Kraczek, E.J., M.F. Hirshman, L.J. Goodyear, and W.W. Winder, 1999, 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle, *Diabetes* 48, 1667-1671.
107. Kuwahara, M., K. Fushimi, Y. Terada, L. Bai, F. Marumo, and S. Sasaki, 1995, cAMP-dependent phosphorylation stimulates water permeability of aquaporin-collecting duct water channel protein expressed in *Xenopus* oocytes, *J Biol. Chem.* 270, 10384-10387.

108. Laemmli,U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.
109. Landis,D.M. and T.S.Reese, 1974, Differences in membrane structure between excitatory and inhibitory synapses in the cerebellar cortex, *J Comp Neurol.* 155, 93-125.
110. Langendorff,O., 1895, Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen, *Pflügers Arch.* 61, 291-332.
111. Lee,M.D., L.S.King, and P.Agre, 1997, The aquaporin family of water channel proteins in clinical medicine, *Medicine (Baltimore)* 76, 141-156.
112. Lehrach,H., D.Diamond, J.M.Wozney, and H.Boedtker, 1977, RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination, *Biochemistry* 16, 4743-4751.
113. Li,J., R.V.Patil, and A.S.Verkman, 2002, Mildly abnormal retinal function in transgenic mice without Muller cell aquaporin-4 water channels, *Invest Ophthalmol.Vis.Sci* 43, 573-579.
114. Light,P.E., B.G.Allen, M.P.Walsh, and R.J.French, 1995, Regulation of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels from rabbit ventricular myocytes by protein kinase C and type 2A protein phosphatase, *Biochemistry* 34, 7252-7257.
115. Lindberg,R.A., A.M.Quinn, and T.Hunter, 1992, Dual-specificity protein kinases: will any hydroxyl do?, *Trends Biochem.Sci.* 17, 114-119.
116. Liu,G.S., M.V.Cohen, D.Mochly-Rosen, and J.M.Downey, 1999, Protein kinase C-epsilon is responsible for the protection of preconditioning in rabbit cardiomyocytes, *J Mol.Cell Cardiol* 31, 1937-1948.
117. Liu,H., H.Y.Zhang, B.C.McPherson, T.Baman, S.Roth, Z.Shao, X.Zhu, and Z.Yao, 2001a, Role of opioid delta1 receptors, mitochondrial K(ATP) channels, and protein kinase C during cardiocyte apoptosis, *J Mol.Cell Cardiol* 33, 2007-2014.
118. Liu,Y., W.D.Gao, B.O'Rourke, and E.Marban, 1996, Synergistic modulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> currents by protein kinase C and adenosine. Implications for ischemic preconditioning, *Circ.Res.* 78, 443-454.
119. Liu,Y., G.Ren, B.O'Rourke, E.Marban, and J.Seharaseyon, 2001b, Pharmacological comparison of native mitochondrial K(ATP) channels with molecularly defined surface K(ATP) channels, *Mol.Pharmacol.* 59, 225-230.
120. Liu,Y., A.Tsuchida, M.V.Cohen, and J.M.Downey, 1995, Pretreatment with angiotensin II activates protein kinase C and limits myocardial infarction in isolated rabbit hearts, *J Mol.Cell Cardiol* 27, 883-892.
121. Loo,D.D., B.A.Hirayama, A.K.Meinild, G.Chandy, T.Zeuthen, and E.M.Wright, 1999, Passive water and ion transport by cotransporters, *J.Physiol* 518 ( Pt 1), 195-202.

122. Lu, M., M.D. Lee, B.L. Smith, J.S. Jung, P. Agre, M.A. Verdijk, G. Merckx, J.P. Rijss, and P.M. Deen, 1996, The human AQP4 gene: definition of the locus encoding two water channel polypeptides in brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93, 10908-10912.
123. Ma, T., A. Frigeri, W. Skach, and A.S. Verkman, 1993, Cloning of a novel rat kidney cDNA homologous to CHIP28 and WCH-CD water channels, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 654-659.
124. Ma, T., B. Yang, W.L. Kuo, and A.S. Verkman, 1996a, cDNA cloning and gene structure of a novel water channel expressed exclusively in human kidney: evidence for a gene cluster of aquaporins at chromosome locus 12q13, *Genomics* 35, 543-550.
125. Ma, T., B. Yang, M.A. Matthay, and A.S. Verkman, 1998, Evidence against a role of mouse, rat, and two cloned human t1alpha isoforms as a water channel or a regulator of aquaporin-type water channels, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19, 143-149.
126. Ma, T., B. Yang, and A.S. Verkman, 1996b, Gene structure, cDNA cloning, and expression of a mouse mercurial-insensitive water channel, *Genomics* 33, 382-388.
127. Ma, T., B. Yang, and A.S. Verkman, 1997, Cloning of a novel water and urea-permeable aquaporin from mouse expressed strongly in colon, placenta, liver, and heart, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240, 324-328.
128. Macey, R.I., 1984, Transport of Water and Urea in Red-Blood-Cells, *American Journal of Physiology* 246, C195-C203.
129. Manley, G.T., M. Fujimura, T. Ma, N. Noshita, F. Filiz, A.W. Bollen, P. Chan, and A.S. Verkman, 2000, Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke, *Nat. Med.* 6, 159-163.
130. Martin, D.R., D.F. Scott, G.L. Downes, and F.O. Belzer, 1972, Primary cause of unsuccessful liver and heart preservation: cold sensitivity of the ATPase system, *Ann. Surg.* 175, 111-117.
131. Martin, S., J.W. Slot, and D.E. James, 1999, GLUT4 trafficking in insulin-sensitive cells. A morphological review, *Cell Biochem. Biophys.* 30, 89-113.
132. Mathai, J.C. and P. Agre, 1999, Hourglass pore-forming domains restrict aquaporin-1 tetramer assembly, *Biochemistry* 38, 923-928.
133. Mayr, M., B. Metzler, Y.L. Chung, E. McGregor, U. Mayr, H. Troy, Y. Hu, M. Leitges, O. Pachinger, J.R. Griffiths, M.J. Dunn, and Q. Xu, 2004, Ischemic preconditioning exaggerates cardiac damage in PKC-delta null mice, *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 287, H946-H956.
134. McManus, M.L., K.B. Churchwell, and K. Strange, 1995, Regulation of cell volume in health and disease, *N. Engl. J. Med.* 333, 1260-1266.
135. McNutt, N.S. and D.W. Fawcett, 1976, The mammalian myocardium. (Langer, G.A. and Brady, A.J. New York 1-66.

136. McPherson, B.C. and Z. Yao, 2001, Morphine mimics preconditioning via free radical signals and mitochondrial K(ATP) channels in myocytes, *Circulation* 103, 290-295.
137. Meyer, M.M. and A.S. Verkman, 1987, Evidence for Water Channels in Renal Proximal Tubule Cell-Membranes, *Journal of Membrane Biology* 96, 107-119.
138. Misaka, T., K. Abe, K. Iwabuchi, Y. Kusakabe, M. Ichinose, K. Miki, Y. Emori, and S. Arai, 1996, A water channel closely related to rat brain aquaporin 4 is expressed in acid- and pepsinogen-secreting cells of human stomach, *FEBS Lett.* 381, 208-212.
139. Miyamae, M., S.A. Camacho, M.W. Weiner, and V.M. Figueredo, 1996, Attenuation of postischemic reperfusion injury is related to prevention of  $[Ca^{2+}]_m$  overload in rat hearts, *Am. J. Physiol* 271, H2145-H2153.
140. Moon, C., L.S. King, and P. Agre, 1997, Aqp1 expression in erythroleukemia cells: genetic regulation of glucocorticoid and chemical induction, *Am. J. Physiol* 273, C1562-C1570.
141. Moses, M.A., P.D. Addison, P.C. Neligan, H. Ashrafpour, N. Huang, M. Zair, A. Rassuli, C.R. Forrest, G.J. Grover, and C.Y. Pang, 2005, Mitochondrial KATP channels in hindlimb remote ischemic preconditioning of skeletal muscle against infarction, *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 288, H559-H567.
142. Mullenheim, J., W. Schlack, J. Frassdorf, A. Heinen, B. Preckel, and V. Thamer, 2001, Additive protective effects of late and early ischaemic preconditioning are mediated by the opening of KATP channels in vivo, *Pflugers Arch.* 442, 178-187.
143. Mullis, K., F. Faloon, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich, 1986, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1, 263-273.
144. Murata, K., K. Mitsuoka, T. Hirai, T. Walz, P. Agre, J.B. Heymann, A. Engel, and Y. Fujiyoshi, 2000, Structural determinants of water permeation through aquaporin-1, *Nature* 407, 599-605.
145. Murata, M., M. Akao, B. O'Rourke, and E. Marban, 2001, Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix  $Ca^{2+}$  overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection, *Circ Res* 89, 891-898.
146. Murphy, S. and W.H. Frishman, 2005, Protein kinase C in cardiac disease and as a potential therapeutic target, *Cardiol Rev.* 13, 3-12.
147. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, 1986, Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium, *Circulation* 74, 1124-1136.
148. Nagelhus, E.A., M.L. Veruki, R. Torp, F.M. Haug, J.H. Laake, S. Nielsen, P. Agre, and O.P. Ottersen, 1998, Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes, *J Neurosci.* 18, 2506-2519.

149. Nakahama,K., A.Fujioka, M.Nagano, S.Satoh, K.Furukawa, H.Sasaki, and Y.Shigeyoshi, 2002, A role of the C-terminus of aquaporin 4 in its membrane expression in cultured astrocytes, *Genes Cells* 7, 731-741.
150. Nakahama,K., M.Nagano, A.Fujioka, K.Shinoda, and H.Sasaki, 1999, Effect of TPA on aquaporin 4 mRNA expression in cultured rat astrocytes, *Glia* 25, 240-246.
151. Nakamura,T. and T.Nagano, 1985, Intramembrane particle distribution in renal collecting tubule cells in normal, dehydrated and hereditary diabetes insipidus rats with particular reference to orthogonal arrays of particles, *J Electron Microsc.* (Tokyo) 34, 364-372.
152. Neely,J.D., B.M.Christensen, S.Nielsen, and P.Agre, 1999, Heterotetrameric composition of aquaporin-4 water channels, *Biochemistry* 38, 11156-11163.
153. Neuhaus,J., 1990, Orthogonal arrays of particles in astroglial cells: quantitative analysis of their density, size, and correlation with intramembranous particles, *Glia* 3, 241-251.
154. Neuhaus,J., E.M.Schmid, and H.Wolburg, 1990, Stability of orthogonal arrays of particles in murine skeletal muscle and astrocytes after circulatory arrest, and human gliomas, *Neurosci.Lett.* 109, 163-168.
155. Nielsen,S., L.S.King, B.M.Christensen, and P.Agre, 1997a, Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat, *Am.J.Physiol* 273, C1549-C1561.
156. Nielsen,S., E.A.Nagelhus, M.Amiry-Moghaddam, C.Bourque, P.Agre, and O.P.Ottersen, 1997b, Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high- resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain, *J Neurosci.* 17, 171-180.
157. Nielsen,S., B.L.Smith, E.I.Christensen, M.A.Knepper, and P.Agre, 1993, CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron, *J.Cell Biol.* 120, 371-383.
158. Nishino,Y., T.Miura, T.Miki, J.Sakamoto, Y.Nakamura, Y.Ikeda, H.Kobayashi, and K.Shimamoto, 2004, Ischemic preconditioning activates AMPK in a PKC-dependent manner and induces GLUT4 up-regulation in the late phase of cardioprotection, *Cardiovasc.Res.* 61, 610-619.
159. Nozawa,Y., T.Miura, T.Miki, Y.Ohnuma, T.Yano, and K.Shimamoto, 2003, Mitochondrial KATP channel-dependent and -independent phases of ischemic preconditioning against myocardial infarction in the rat, *Basic Res.Cardiol* 98, 50-58.
160. Okubo,S., Y.Tanabe, N.Fujioka, K.Takeda, and N.Takekoshi, 2003, Differential activation of protein kinase C between ischemic and pharmacological preconditioning in the rabbit heart, *Jpn.J Physiol* 53, 173-180.
161. Oliet,S.H. and C.W.Bourque, 1993, Mechanosensitive channels transduce osmosensitivity in supraoptic neurons, *Nature* 364, 341-343.

162. Orci,L., R.Montesano, and A.Perrelet, 1981, Exocytosis-endocytosis as seen with morphological probes of membrane organization, *Methods Cell Biol.* 23, 283-300.
163. Page,E., J.Winterfield, G.Goings, A.Bastawrous, and J.Upshaw-Earley, 1998, Water channel proteins in rat cardiac myocyte caveolae: osmolarity- dependent reversible internalization, *Am J Physiol* 274, H1988-H2000.
164. Parker,J.C., 1993, In defense of cell volume?, *Am.J.Physiol* 265, C1191-C1200.
165. Paula,S., A.G.Volkov, and D.W.Deamer, 1998, Permeation of halide anions through phospholipid bilayers occurs by the solubility-diffusion mechanism, *Biophys.J.* 74, 319-327.
166. Paula,S., A.G.Volkov, A.N.van Hoek, T.H.Haines, and D.W.Deamer, 1996, Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness, *Biophys.J.* 70, 339-348.
167. Peralta,C., N.Prats, C.Xaus, E.Gelpi, and J.Rosello-Catafau, 1999, Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat, *Hepatology* 30, 1481-1489.
168. Perkins,G.A. and T.G.Frey, 2000, Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy, *Micron.* 31, 97-111.
169. Piper,H.M., I.Probst, P.Schwartz, F.J.Hutter, and P.G.Spieckermann, 1982, Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes, *J.Mol.Cell Cardiol.* 14, 397-412.
170. Pollesello,P. and A.Mebazaa, 2004, ATP-dependent potassium channels as a key target for the treatment of myocardial and vascular dysfunction, *Curr.Opin.Crit Care* 10, 436-441.
171. Post,S. and K.Messmer, 1996, [The role of reperfusion damage], *Chirurg* 67, 318-323.
172. Powell,T., E.M.Steen, V.W.Twist, and N.Woolf, 1978, Surface characteristics of cells isolated from adult rat myocardium, *J.Mol.Cell Cardiol.* 10, 287-292.
173. Preston,G.M. and P.Agre, 1991, Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88, 11110-11114.
174. Preston,G.M., T.P.Carroll, W.B.Guggino, and P.Agre, 1992, Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein, *Science* 256, 385-387.
175. Quast,U. and N.S.Cook, 1989a, In vitro and in vivo comparison of two K<sup>+</sup> channel openers, diazoxide and cromakalim, and their inhibition by glibenclamide, *J Pharmacol Exp Ther* 250, 261-271.
176. Quast,U. and N.S.Cook, 1989b, Moving together: K<sup>+</sup> channel openers and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels, *Trends Pharmacol Sci* 10, 431-435.

177. Rash, J.E., K.G. Davidson, T. Yasumura, and C.S. Furman, 2004, Freeze-fracture and immunogold analysis of aquaporin-4 (AQP4) square arrays, with models of AQP4 lattice assembly, *Neuroscience* 129, 915-934.
178. Ravingerova, T., M. Barancik, and M. Strniskova, 2003, Mitogen-activated protein kinases: a new therapeutic target in cardiac pathology, *Mol. Cell Biochem.* 247, 127-138.
179. Ross, J., 1995, mRNA stability in mammalian cells, *Microbiol. Rev.* 59, 423-450.
180. Rupp, R.A. and H. Weintraub, 1991, Ubiquitous MyoD transcription at the mid-blastula transition precedes induction-dependent MyoD expression in presumptive mesoderm of *X. laevis*, *Cell* 65, 927-937.
181. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, *Molecular cloning, A Laboratory Manual.* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
182. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, 1977, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 74, 5463-5467.
183. Sato, T., N. Sasaki, B. O'Rourke, and E. Marban, 2000a, Adenosine primes the opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels: a key step in ischemic preconditioning?, *Circulation* 102, 800-805.
184. Sato, T., N. Sasaki, J. Seharaseyon, B. O'Rourke, and E. Marban, 2000b, Selective pharmacological agents implicate mitochondrial but not sarcolemmal K(ATP) channels in ischemic cardioprotection, *Circulation* 101, 2418-2423.
185. Schipke, J.D., B. Korbmayer, U. Schwanke, D. Frehen, T. Schmidt, and G. Arnold, 1998, Basal metabolism does not account for high O<sub>2</sub> consumption in stunned myocardium, *Am J Physiol* 274, H743-H746.
186. Schmiedl, A., P.A. Schnabel, K. Marten, B. Kausch, V., and J. Richter, 1999, Electron microscopic stereology of capillary endothelial cells and cardiomyocytes in artificially arrested canine hearts, *Med. Electron Microsc.* 32, 151-160.
187. Schnermann, J., C.L. Chou, T. Ma, T. Traynor, M.A. Knepper, and A.S. Verkman, 1998, Defective proximal tubular fluid reabsorption in transgenic aquaporin-1 null mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95, 9660-9664.
188. Schwanke, U., A. Deussen, G. Heusch, and J.D. Schipke, 2000, Heterogeneity of local myocardial flow and oxidative metabolism, *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 279, H1029-H1035.
189. Shi, L.B., W.R. Skach, T. Ma, and A.S. Verkman, 1995, Distinct biogenesis mechanisms for the water channels MIWC and CHIP28 at the endoplasmic reticulum, *Biochemistry* 34, 8250-8256.
190. Shiels, A. and S. Bassnett, 1996, Mutations in the founder of the MIP gene family underlie cataract development in the mouse, *Nat. Genet.* 12, 212-215.

191. Silberstein,C., R.Bouley, Y.Huang, P.Fang, N.Pastor-Soler, D.Brown, and A.N.van Hoek, 2004, Membrane organization and function of M1 and M23 isoforms of aquaporin-4 in epithelial cells, *Am.J Physiol Renal Physiol* 287, F501-F511.
192. Silver,I.A. and M.Erecinska, 1994, Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals, *J Neurosci.* 14, 5068-5076.
193. Sobue,K., N.Yamamoto, K.Yoneda, K.Fujita, Y.Miura, K.Asai, T.Tsuda, H.Katsuya, and T.Kato, 1999, Molecular cloning of two bovine aquaporin-4 cDNA isoforms and their expression in brain endothelial cells, *Biochim.Biophys.Acta* 1489, 393-398.
194. Sorota,S., 1992, Swelling-induced chloride-sensitive current in canine atrial cells revealed by whole-cell patch-clamp method, *Circ.Res.* 70, 679-687.
195. Spring,K.R., 1999, Epithelial Fluid Transport--A Century of Investigation, *News Physiol Sci.* 14, 92-98.
196. Staehelin,L.A., 1972, Three types of gap junctions interconnecting intestinal epithelial cells visualized by freeze-etching, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 69, 1318-1321.
197. Sui,H., B.G.Han, J.K.Lee, P.Walian, and B.K.Jap, 2001, Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel, *Nature* 414, 872-878.
198. Suleymanian,M.A. and C.M.Baumgarten, 1996, Osmotic gradient-induced water permeation across the sarcolemma of rabbit ventricular myocytes, *J Gen.Physiol* 107, 503-514.
199. Suzuki,M., N.Sasaki, T.Miki, N.Sakamoto, Y.Ohmoto-Sekine, M.Tamagawa, S.Seino, E.Marban, and H.Nakaya, 2002, Role of sarcolemmal K(ATP) channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice, *J Clin Invest* 109, 509-516.
200. Terris,J., C.A.Ecelbarger, D.Marples, M.A.Knepper, and S.Nielsen, 1995, Distribution of aquaporin-4 water channel expression within rat kidney, *Am.J.Physiol* 269, F775-F785.
201. Till,M., T.Kolter, and J.Eckel, 1997, Molecular mechanisms of contraction-induced translocation of GLUT4 in isolated cardiomyocytes, *Am.J Cardiol* 80, 85A-89A.
202. Tomai,F., F.Crea, A.Gaspardone, F.Versaci, R.De Paulis, d.P.Penta, L.Chiariello, and P.A.Gioffre, 1994, Ischemic preconditioning during coronary angioplasty is prevented by glibenclamide, a selective ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel blocker, *Circulation* 90, 700-705.
203. Trube,G. and P.Rorsman, 1986, Calcium and potassium currents recorded from pancreatic beta-cells under voltage clamp control, *Adv.Exp.Med.Biol.* 211, 167-175.

204. Uchiyama, Y., H. Otani, M. Wakeno, T. Okada, T. Uchiyama, T. Sumida, M. Kido, H. Imamura, S. Nakao, and K. Shingu, 2003, Role of mitochondrial KATP channels and protein kinase C in ischaemic preconditioning, *Clin Exp. Pharmacol. Physiol* 30, 426-436.
205. Um, J.W., J.B. Matthews, J.C. Song, and E.C. Mun, 2005, Role of protein kinase C in intestinal ischemic preconditioning, *J Surg. Res.* 124, 289-296.
206. Umenishi, F. and A.S. Verkman, 1998, Isolation and functional analysis of alternative promoters in the human aquaporin-4 water channel gene, *Genomics* 50, 373-377.
207. Uphues, I., T. Kolter, B. Goud, and J. Eckel, 1994, Insulin-induced translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac muscle: studies on the role of small-molecular-mass GTP-binding proteins, *Biochem. J* 301 ( Pt 1), 177-182.
208. Urlaub, G., P.J. Mitchell, C.J. Ciudad, and L.A. Chasin, 1989, Nonsense mutations in the dihydrofolate reductase gene affect RNA processing, *Mol. Cell Biol.* 9, 2868-2880.
209. Uyama, O., T. Matsuyama, H. Michishita, H. Nakamura, and M. Sugita, 1992, Protective effects of human recombinant superoxide dismutase on transient ischemic injury of CA1 neurons in gerbils, *Stroke* 23, 75-81.
210. Vahouny, G.V., R.W. Wei, A. Tamboli, and E.N. Albert, 1979, Adult canine myocytes: isolation, morphology and biochemical characteristics, *J. Mol. Cell Cardiol.* 11, 339-357.
211. Valenti, G., G. Procino, M. Carmosino, A. Frigeri, R. Mannucci, I. Nicoletti, and M. Svelto, 2000, The phosphatase inhibitor okadaic acid induces AQP2 translocation independently from AQP2 phosphorylation in renal collecting duct cells, *J Cell Sci* 113 ( Pt 11), 1985-1992.
212. van Balkom, B.W., P.J. Savelkoul, D. Markovich, E. Hofman, S. Nielsen, S.P. van der, and P.M. Deen, 2002, The role of putative phosphorylation sites in the targeting and shuttling of the aquaporin-2 water channel, *J Biol. Chem.* 277, 41473-41479.
213. van Hoek, A.N., M.D. de Jong, and C.H. van Os, 1990, Effects of dimethylsulfoxide and mercurial sulfhydryl reagents on water and solute permeability of rat kidney brush border membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 1030, 203-210.
214. van Hoek, A.N., M.L. Hom, L.H. Luthjens, M.D. de Jong, J.A. Dempster, and C.H. van Os, 1991, Functional unit of 30 kDa for proximal tubule water channels as revealed by radiation inactivation, *J. Biol. Chem.* 266, 16633-16635.
215. van Hoek, A.N., T. Ma, B. Yang, A.S. Verkman, and D. Brown, 2000, Aquaporin-4 is expressed in basolateral membranes of proximal tubule S3 segments in mouse kidney, *Am. J. Physiol Renal Physiol* 278, F310-F316.
216. Van Winkle, D.M., G.L. Chien, R.A. Wolff, B.E. Soifer, K. Kuzume, and R.F. Davis, 1994, Cardioprotection provided by adenosine receptor activation is abolished by blockade of the KATP channel, *Am. J Physiol* 266, H829-H839.

217. Vandenberg, J.I., S.A. Rees, A.R. Wright, and T. Powell, 1996, Cell swelling and ion transport pathways in cardiac myocytes, *Cardiovasc. Res.* 32, 85-97.
218. Vandenberg, J.I., A. Yoshida, K. Kirk, and T. Powell, 1994, Swelling-activated and isoprenaline-activated chloride currents in guinea pig cardiac myocytes have distinct electrophysiology and pharmacology, *J. Gen. Physiol* 104, 997-1017.
219. Verbavatz, J.M., D. Brown, I. Sabolic, G. Valenti, D.A. Ausiello, A.N. van Hoek, T. Ma, and A.S. Verkman, 1993, Tetrameric assembly of CHIP28 water channels in liposomes and cell membranes: a freeze-fracture study, *J. Cell Biol.* 123, 605-618.
220. Verbavatz, J.M., T. Ma, R. Gobin, and A.S. Verkman, 1997, Absence of orthogonal arrays in kidney, brain and muscle from transgenic knockout mice lacking water channel aquaporin-4, *J Cell Sci.* 110 ( Pt 22), 2855-2860.
221. Verkman, A.S., 2000, Physiological importance of aquaporins: lessons from knockout mice, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 9, 517-522.
222. Verkman, A.S., P. Weyer, D. Brown, and D.A. Ausiello, 1989, Functional Water Channels Are Present in Clathrin-Coated Vesicles from Bovine Kidney But Not from Brain, *Journal of Biological Chemistry* 264, 20608-20613.
223. Verkman, A.S., B. Yang, Y. Song, G.T. Manley, and T. Ma, 2000, Role of water channels in fluid transport studied by phenotype analysis of aquaporin knockout mice, *Exp. Physiol* 85 Spec No, 233S-241S.
224. Wagner, O.I., J. Lifshitz, P.A. Janmey, M. Linden, T.K. McIntosh, and J.F. Leterrier, 2003, Mechanisms of mitochondria-neurofilament interactions, *J Neurosci.* 23, 9046-9058.
225. Walker, D.M., J.M. Walker, and D.M. Yellon, 1993, Global myocardial ischemia protects the myocardium from subsequent regional ischemia, *Cardioscience* 4, 263-266.
226. Walsh, R.S., A. Tsuchida, J.J. Daly, J.D. Thornton, M.V. Cohen, and J.M. Downey, 1994, Ketamine-xylazine anaesthesia permits a KATP channel antagonist to attenuate preconditioning in rabbit myocardium, *Cardiovasc. Res.* 28, 1337-1341.
227. Wang, K.S., A.R. Komar, T. Ma, F. Filiz, J. McLeroy, K. Hoda, A.S. Verkman, and J.A. Bastidas, 2000, Gastric acid secretion in aquaporin-4 knockout mice, *Am. J Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 279, G448-G453.
228. Wang, L., G. Cherednichenko, L. Hernandez, J. Halow, S.A. Camacho, V. Figueredo, and S. Schaefer, 2001a, Preconditioning limits mitochondrial Ca<sup>2+</sup> during ischemia in rat hearts: role of K(ATP) channels, *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 280, H2321-H2328.
229. Wang, Y., K. Hirai, and M. Ashraf, 1999, Activation of mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel for cardiac protection against ischemic injury is dependent on protein kinase C activity, *Circ. Res.* 85, 731-741.

230. Wang, Y., M. Kudo, M. Xu, A. Ayub, and M. Ashraf, 2001b, Mitochondrial K(ATP) channel as an end effector of cardioprotection during late preconditioning: triggering role of nitric oxide, *J Mol. Cell Cardiol* 33, 2037-2046.
231. Wang, Y., E. Takashi, M. Xu, A. Ayub, and M. Ashraf, 2001c, Downregulation of protein kinase C inhibits activation of mitochondrial K(ATP) channels by diazoxide, *Circulation* 104, 85-90.
232. Wang, Y.G. and S.L. Lipsius, 1995, Acetylcholine activates a glibenclamide-sensitive K<sup>+</sup> current in cat atrial myocytes, *Am. J Physiol* 268, H1322-H1334.
233. Weaver, C.D., N.H. Shomer, C.F. Louis, and D.M. Roberts, 1994, Nodulin 26, a nodule-specific symbiosome membrane protein from soybean, is an ion channel, *J. Biol. Chem.* 269, 17858-17862.
234. Wetmut, J., 1991, DNA Probes: Applications of the Principles of Nucleic Acid Hybridization., *Crit Rev Biochem Mol Biol* 26, 227-259.
235. Widdicombe, J.H., D.L. Coleman, W.E. Finkbeiner, and D.S. Friend, 1987, Primary cultures of the dog's tracheal epithelium: fine structure, fluid, and electrolyte transport, *Cell Tissue Res.* 247, 95-103.
236. Wolfe, C.L., R.E. Sievers, F.L. Visseren, and T.J. Donnelly, 1993, Loss of myocardial protection after preconditioning correlates with the time course of glycogen recovery within the preconditioned segment, *Circulation* 87, 881-892.
237. Yamamoto, N., K. Sobue, T. Miyachi, M. Inagaki, Y. Miura, H. Katsuya, and K. Asai, 2001, Differential regulation of aquaporin expression in astrocytes by protein kinase C, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 95, 110-116.
238. Yamashita, Y., K. Hirai, Y. Katayama, K. Fushimi, S. Sasaki, and F. Marumo, 2000, Mutations in sixth transmembrane domain of AQP2 inhibit its translocation induced by vasopression, *Am J Physiol Renal Physiol* 278, F395-F405.
239. Yang, B., D. Brown, and A.S. Verkman, 1996, The mercurial insensitive water channel (AQP-4) forms orthogonal arrays in stably transfected Chinese hamster ovary cells, *J Biol. Chem.* 271, 4577-4580.
240. Yang, B., T. Ma, and A.S. Verkman, 1995, cDNA cloning, gene organization, and chromosomal localization of a human mercurial insensitive water channel. Evidence for distinct transcriptional units, *J. Biol. Chem.* 270, 22907-22913.
241. Yang, B., A.N. van Hoek, and A.S. Verkman, 1997, Very high single channel water permeability of aquaporin-4 in baculovirus-infected insect cells and liposomes reconstituted with purified aquaporin-4, *Biochemistry* 36, 7625-7632.
242. Yang, B. and A.S. Verkman, 1997, Water and glycerol permeabilities of aquaporins 1-5 and MIP determined quantitatively by expression of epitope-tagged constructs in *Xenopus* oocytes, *J. Biol. Chem.* 272, 16140-16146.
243. Yool, A.J., W.D. Stamer, and J.W. Regan, 1996, Forskolin stimulation of water and cation permeability in aquaporin 1 water channels, *Science* 273, 1216-1218.

244. Zaugg, M. and M.C. Schaub, 2003, Signaling and cellular mechanisms in cardiac protection by ischemic and pharmacological preconditioning, *J Muscle Res. Cell Motil.* 24, 219-249.
245. Zeidel, M.L., S.V. Ambudkar, B.L. Smith, and P. Agre, 1992, Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein, *Biochemistry* 31, 7436-7440.
246. Zeuthen, T. and D.A. Klaerke, 1999, Transport of water and glycerol in aquaporin 3 is gated by H(+), *J Biol. Chem.* 274, 21631-21636.
247. Zhang, J., R.L. Rasmusson, S.K. Hall, and M. Lieberman, 1993, A chloride current associated with swelling of cultured chick heart cells, *J Physiol* 472, 801-820.
248. Zhang, R., S.L. Alper, B. Thorens, and A.S. Verkman, 1991, Evidence from oocyte expression that the erythrocyte water channel is distinct from band 3 and the glucose transporter, *J. Clin. Invest* 88, 1553-1558.

## Danksagung

Ich möchte zuerst meiner Frau Christa danken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation immer sehr geduldig unterstützt, aufgebaut und ermutigt hat. Ich danke ihr auch dafür, dass sie Ihre Zeit für Diskussionen, Gespräche und Anregungen für mich opferte.

Meinen Kindern danke ich nachdrücklich; Sie haben in dem Zeitraum der Fertigstellung dieser Arbeit sehr wenig Zeit mit mir verbringen können.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Heinz Mehlhorn für sein fachliches Interesse an dieser Arbeit und seine Bereitschaft, als mein Doktorvater das Referat für diese Arbeit zu übernehmen.

Die vorliegende Arbeit wurde durch die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes durch Herrn Prof. Dr. Gams an der Klinik für Kardiovaskuläre- und Thoraxchirurgie in der Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie ermöglicht.

Mein Dank geht vor allem Herrn Prof. Dr. Jochen D. Schipke für die interessante Aufgabenstellung. In seiner Forschungsgruppe konnte ich meine Dissertation erstellen. Er brachte dieser Arbeit stets höchstes Interesse entgegen. Die vielen gemeinsamen Diskussionen ermöglichten ein erfolgreiches Fortschreiten der Dissertation. Er ermöglichte mir die Teilnahme an einer Reihe wissenschaftlicher Kongresse, auf denen ich meine Arbeit vorstellen konnte, und auf denen Kontakte für wertvolle Kooperationen geschlossen wurden.

Meinen Kollegen in der Forschungsgruppe möchte ich für die angenehme freundschaftliche Arbeitsatmosphäre danken, für welche das Wort Teamarbeit wirklich zutrifft. Frau Rummel möchte ich an dieser Stelle für die zeitaufwendige und mit hoher Präzision erfolgte Durchsicht dieser Arbeit und die Unterstützung am Layout danken.

Außerdem möchte ich Herrn Dr. Volker Stoldt für zahlreiche fachliche Anregungen, aufmunternde Worte und gute Ideen sowie für die Durchsicht dieses Manuskriptes danken. Der Dank gilt auch für die fachliche Unterstützung bei der Erstellung der konfokalen Bilddaten.

## Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation

**Charakterisierung der transmembranen Wasserkanalproteine (Aquaporine) am  
Beispiel des Säugermuskels: Regulatoren des Wassertransports in  
Kardiomyozyten**

Habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

---

Unterschrift:

---

(David Calvo Sanchez)