Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

# Untersuchung der Rolle des IGF-1 und des Ea-Peptids im isolierten Mausherzen nach Langendorff während der Akutphase nach kardialer Ischämie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Heiko Alexander Reffelt

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke Zweitgutachterin: PD Dr. med. Anna Herminghaus Für meine Familie

"Probleme kann man niemals mit derselben Denkweise lösen, durch die sie entstanden sind."

- Albert Einstein -

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Heinen A, Nederlof R, Panjwani P, Spychala A, Tschaidse T, Reffelt H, Boy J, Raupach A, Godecke S, Petzsch P, Kohrer K, Grandoch M, Petz A, Fischer JW, Alter C, Vasilevska J, Lang P and Godecke A. IGF1 Treatment Improves Cardiac Remodeling after Infarction by Targeting Myeloid Cells. Mol Ther. 2019; 27:46-58.

## Zusammenfassung

Epidemiologische Daten zeigen, dass bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt niedrigere IGF-1 Spiegel mit einer schlechteren Prognose korrelieren. Dieser kardioprotektive Effekt von IGF-1 wird auch in präklinischen, tierexperimentellen Arbeiten bestätigt. Ein besonders ausgeprägter kardioprotektiver Effekt wurde in einer transgenen Mauslinie mit kardialer Überexpression des Propeptids IGF-1/Ea nachgewiesen. Allerdings ist hierbei unklar, ob der protektive Effekt ausschließlich auf das reife IGF-1 zurückzuführen ist, oder ob dem Ea-Peptid eine Bedeutung zukommt. Grundlage für diese Frage sind Hinweise aus Zellkulturexperimenten, in welchen sowohl eine direkte biologische Wirkung des Ea-Peptids als auch eine Modulation von IGF-1 induzierten Effekten nachgewiesen werden konnte. Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit untersucht, ob IGF-1, das Ea-Peptid oder eine Kombination beider eine kardioprotektive Wirkung auf den akuten Myokardschaden nach einer myokardialen Ischämie und Reperfusion haben. Hierzu wurden isolierte Herzen männlicher C57Bl/6J Mäuse an der Langendorff-Anlage perfundiert. Nach einer Einschlagphase durchliefen die Herzen eine 25 minütige globale Ischämie sowie eine 60 minütige Reperfusion. Während der Reperfusion wurden IGF-1, das Ea-Peptid, IGF-1 plus Ea-Peptid oder Vehikel appliziert, und die linksventrikuläre Funktion sowie die LDH-Freisetzung analysiert. Zudem wurde die Phosphorylierung der Proteinkinasen AKT, GSK und ERK mittels Western Blot sowohl in den Herzen, welche die Ischämie und Reperfusion unterliefen, als auch in nichtischämischen Herzen untersucht.

IGF-1, das Ea-Peptid und die Kombination beider Substanzen hatte weder einen Effekt auf die kardiale Funktion noch auf die LDH-Freisetzung nach myokardialer Ischämie und Reperfusion. Des Weiteren hatte das Ea-Peptid keinen Effekt auf den Phosphorylierungsgrad von AKT, GSK und ERK, und führte zu keiner Modulation der IGF-1 aktivierten Signalwege, sowohl nach Ischämie und Reperfusion, als auch ohne Ischämie.

Zusammenfassend haben IGF-1 und das Ea-Peptid keinen protektiven Effekt im isolierten Herzmodell nach Langendorff während der Akutphase nach kardialer Ischämie. Das Ea-Peptid hat keinen signifikanten Effekt auf die IGF-1 Signalkaskade am isolierten Herzen mit und ohne Ischämie.

## Summary

Epidemiological data have shown a poor prognosis after myocardial infarction for patients with lower IGF-1 serum concentrations. This cardioprotective effect of IGF-1 has also been seen in animal models, especially in transgenic mice with an overexpression of the propeptid IGF-1/Ea. However, it has not been investigated, if the cardioprotection is caused by IGF-1 alone or if the Ea peptid could be an important factor.

Recently cell experiments have provided evidence that Ea might have an own biological activity and modulate the IGF-1 signaling. Based on that findings it was investigated, if IGF-1, Ea or a combination of both is able to reduce myocardial injury after ischemia and reperfusion. Isolated and perfused hearts of C57Bl/6J mice in a Langendorff model were analyzed. After a period of stabilization, the hearts underwent 25 minutes of ischemia, to be followed by 60 minutes of reperfusion. During reperfusion IGF-1, Ea, a combination of both or vehicel were applied, and heart function and LDH release were monitored. Moreover, the phosphorylation of the protein kinases AKT, GSK and ERK of hearts exposed to ischemia/reperfusion and of hearts that did not underwent ischemia/reperfusion were analyzed by a Western blot.

Neither IFG-1, Ea nor a combination of both had an effect on the cardiac function or the release of LDH after myocardial ischemia and reperfusion.

Furthermore, Ea did not have an effect on the phosphorylation of AKT, GSK, and ERK or modulate the IGF-1 signaling with or without ischemia and reperfusion.

In summary, IGF-1 and the Ea-Peptide did not improve the outcome after acute myocardial infarction in an isolated Langendorff heart model. Ea-Peptide did not modulate IGF-1 mediated effects on protein phosphorylation with and without ischemia of the isolated heart.

# Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
А	Ampere
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
АКТ	Proteinkinase B
AMI	Akuter Myokardinfarkt
AOP	Perfusionsdruck
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
AS160	Akt substrate of 160 kDa
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Bcl-2-associated X protein
BCA	Bicinchoninsäure-Assay
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BMI	Body-Mass-Index
BPM	Beats per minute - Schläge pro Minute
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl2*H2O	Calciumchlorid-Dihydrat
CF	Koronarfluss
D	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DDT	Dithiothreitol
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonucleic acid
dP/dt	Druckänderungsgeschwindigkeit
EC50	Mittlere effektive Konzentration
ED50	Mittlere effektive Dosis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiographie
ERK	Extracellular-signal regulated kinases
FOXO	Forkhead box-containing protein
g	Gramm

GH	Growth hormone
Glukose*H2O	Glukose Monohydrat
GLUT4	Glucose transporter type 4
GRB2	Growth factor receptor-bound 2
GSK	Glykogensynthase-Kinase
GTP	Guanosintriphosphat
H <sub>2</sub> O	Wasser
HIF-1a	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
НКР	Herz- und Kreislaufphysiologie Düsseldorf
HR	Herzfrequenz
I.E.	Internationale Einheiten
IGF-1	Insulin-like growth factor 1, Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1
IGFBP	Insulin-like growth factor 1 binding protein
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IRS	Insulin Rezeptor Substrat
k-	Kilo
KCl	Kaliumchlorid
KH-Puffer	Krebs-Henseleit Puffer
KH2PO4	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
LVDP	Entwickelter Druck (Differenz zwischen LVSP und LVEDP)
LVEDP	Enddiastolischer Druck
LVP	Linksventrikulärer Druck
LVSP	Linksventrikulärer Spitzendruck
m-	Milli
m	Meter
М	Molar
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein
max.	maximal
MgSO <sub>2</sub> *7H <sub>2</sub> O	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
min.	minimal
Min	Minuten
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule

Mol	Stoffmenge (6.02214076*10 <sup>23</sup> , Avogadro-Konstante)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC	mammalian target of rapamycin complex
n-	Nano
n	Versuchszahl
Na2HPO4*2H2O	di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid-Hydrogen
NaHCO3	Natriumhydrogencarbonat
ns	nicht signifikant
NSTEMI	Nicht-ST-Hebungsinfarkt
ORW	Oberer Referenzwert
p-	Phospho-
pan-	gesamt
PBS	Phosphate buffered saline
PCI	Perkutane Koronarintervention
PCR	Polymerase chain reaction
PDK:	Phosphoinositide-dependent Kinase
PE	Polyethylen
pН	Potential des Wasserstoffs
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat
PLCβ	Phospholipase Cβ1
РТВ	Phosphothyrosin-binding
Raf	Rapidly Accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPP	rate pressure product
S	Sekunde
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SDS	Natriumdodecylsulfat

Ser	Serin
SH2	Scr homology 2
Shc	Src homology 2 domain containing transforming protein
SOS	Son of Sevenless
STEMI	ST-Hebungsinfarkt
Tat	Twin-Arginine Translocation
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
TNF-a	Tumor necrosis factor-α
TRIS	N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-glycin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSC2	Tuberous sclerosis complex 2
Tween	Polyethylenglykol-Sorbitan-Fettsäureester
Tyr	Tyrosin
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vmax	Maximale Geschwindigkeit
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche
	Tierschutzaufgaben
μ-	Mikro

## Inhaltsverzeichnis

1	Einle	inleitung1	
	1.1	Der akute Myokardinfarkt – Allgemeines	1
	1.2	Pathophysiologie des akuten Myokardinfarkts	2
	1.3	Anpassungsprozess nach akutem Myokardinfarkt	3
	1.4	Myokardinfarkt und IGF-1; epidemiologische Aspekte	4
	1.5	Physiologische Aspekte des IGF-1	4
	1.6	Intrazelluläre Signalwege IGF-1	6
	1.7	IGF-1 und das Ea-Peptid	8
	1.8	IGF-1 und Myokardinfarkt: Experimentelle Daten	9
	1.9	Ableitung der Fragestellung – Ziele der Arbeit	10
2	Mater	rial und Methoden	11
	2.1	Verwendete Laborgeräte	11
	2.2	Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Gele und Puffer	12
		2.2.1 Langendorff-Modell	12
		2.2.2 Western Blot	12
		2.2.3 LDH Assay	13
	2.3	Antikörper für die Western Blots	13
	2.4	Verwendete Peptide	14
	2.5	2.5 Mausstamm	
	2.6	Das isolierte Herzmodell nach Langendorff	15
		2.6.1 Aufbau für druckkonstante Perfusion des Herzens	15
		2.6.2 Vorbereitung der Versuchstiere	16
		2.6.3 Exzision, Präparation und Aufhängen des Mäuseherzens	16
		2.6.4 Platzierung des Ballonkatheters	17
		2.6.5 Herstellung des Ballonkatheters	17
		2.6.6 Messinstrumente, Aufzeichnung der Messwerte und Eichen	18
		2.6.7 Zeitliche Abfolge: Aufhänge- und Einschlagphase	18
		2.6.8 Physiologische Parameter des isolierten Herzens	19
		2.6.9 Applikation von IGF-1, Ea, IGF-1+Ea oder Vehikel	19
		2.6.10 Versuchsprotokolle	19
		2.6.11 Einfrieren des Mausherzens	21
		2.6.12 Auswertung der Hämodynamik	21
	2.7	LDH Aktivität im Effluat der Mäuseherzen im Langendorff Modell	23
		2.7.1 Bestimmung der LDH Aktivität mittels NADH Absorptionsänderu	ng 23
		2.7.2 Auswertung der Absorptionsänderung	24
	2.8 Antik	Analyse der Proteinphosphorylierung im Western Blot m körperfärbung	nittels 24

		2.8.1 Aufbereitung und Lagerung der Herzen zur Proteingewinnung	.24
		2.8.2 BCA-Assay	.24
		2.8.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)	.25
		2.8.4 Western Blot	.25
		2.8.5 Auftragen des ersten und zweiten Antikörpers	.26
		2.8.6 Messung der Signale	.26
		2.8.7 Auswertung	.26
	2.9	Verwendete Computerprogramme	.27
	2.10	Statistik	27
3	Ergebi	isse	29
	3.1	IGF-1 – Konzentrationsfindung	.29
	3.2	Akutgabe von IGF-1 bzw. Ea-Peptid und Proteinphosphorylierung	30
	3.3	Herzfunktion im Ischämie- und Reperfusionsmodell	33
	3.4	LDH Aktivität im Effluat nach Ischämie	35
	3.5	Proteinphosphorylierung nach Ischämie und Reperfusion	36
4	Diskus	sion	39
	4.1	Schlussfolgerungen	39
	4.2	Eingesetzte IGF-1 Konzentration	39
	4.3	IGF-1, Ea-Peptid und intrazelluläres Signaling	40
	4.4	IGF-1, Ea-Peptid und Ischämie/Reperfusion: Kardiale Funktion	41
	4.5	IGF-1, Ea-Peptid und Ischämie/Reperfusion: Akuter Myokardschaden	43
5	Literat	urverzeichnis	44

## 1 Einleitung

#### 1.1 Der akute Myokardinfarkt – Allgemeines

In Deutschland verstarben 2020 laut Statistischem Bundesamt 44.529 Patienten an einem akuten Myokardinfarkt (AMI).<sup>1</sup> Der akute Myokardinfarkt stellt damit eine der führenden Todesursachen in Deutschland dar.<sup>2</sup> Neben genetischen Faktoren beeinflussen das Alter, das Geschlecht<sup>3</sup>, Ernährung, BMI, Bewegungsgewohnheiten und Rauchen das Risiko eines Herzinfarkts.<sup>4, 5</sup>

Nach der Definition der *European Society of Cardiology* von 2018 kann man fünf Typen des akuten Myokardinfarkts unterscheiden, wobei bei allen Typen eine akute Myokardschädigung durch eine Ischämie auftritt<sup>6</sup>:

- Myokardinfarkt Typ 1: Atherosklerotische Plaqueruptur mit Koronarthrombus
- Myokardinfarkt Typ 2: Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf
- Myokardinfarkt Typ 3: Herztod mit Myokardinfarkt-typischer Symptomatik oder EKG Veränderung, ohne biochemische Sicherung mittels kardialer Biomarker
- Myokardinfarkt Typ 4: PCI-assoziiert, c-Troponin-Werte > 5 x 99. Perzentil ORW bei Patienten plus Myokardinfarkt-typische EKG Veränderungen, neuer Wandbewegungsstörung oder Nachweis eines pathologischen angiographischen Befundes.
  - Myokardinfarkt Typ 4a: Peri-interventionell
  - Myokardinfarkt Typ 4b: Stent- oder Scaffold-Thrombose
  - Myokardinfarkt Typ 4c: Restenose
- Myokardinfarkt Typ 5: Koronararterielle Bypass-Operation assoziiert

Infarktpatienten zeigen oft eine typische Symptomatik mit retrosternalem Thoraxschmerz, teils mit Ausstrahlung in den linken Arm, den linken Oberkörper oder in das Epigastrium.<sup>6</sup>

Eine passende Symptomatik und eine Erhöhung des c-Troponinwertes oberhalb der 99. Perzentile des oberen Richtwertes plus Anstieg oder Abfall des Troponins innerhalb von 1-2 Stunden im hochsensitiven Troponin-Assay führen dann zur Diagnose eines akuten Myokardinfarkts.<sup>6</sup> In der Elektrokardiographie kann man zwischen einem ST-Hebungs-Myokardinfarkt (STEMI) und einem Nicht-ST-Hebungs-Myokardinfarkt (NSTEMI) unterscheiden.<sup>6</sup> Für die Diagnose eines STEMIs müssen ST-Streckenhebungen in zwei zusammenpassenden Ableitungen oder ein Schenkelblock mit ischämischer Repolarisation neu auftreten. Patienten mit Symptomatik einer Myokardischämie und EKG-Veränderungen wie ST-Streckensenkungen, T-Wellen-Veränderungen werden als NSTEMI kategorisiert.<sup>6</sup> Die Unterscheidung ist wichtig für die Beurteilung der Dringlichkeit der Behandlung. Bei einem STEMI muss innerhalb von 90-120 Minuten eine Reperfusionstherapie mittels perkutaner Koronarintervention, Ballondilation und ggf. Stenteinlage durchgeführt werden. Ist das nicht möglich, sollte eine systemische Lysetherapie erfolgen.<sup>7</sup> Für einen Nicht-ST-Hebungsinfarkt gilt aktuell die Empfehlung einer Koronarangiographie innerhalb von 2-72 Stunden abhängig von der wahrscheinlichen Mortalität (Grace Risk Score), vorhandenen Risikofaktoren und den Symptomen des Patienten.<sup>7</sup>

Die medikamentöse Therapie in der Akutphase umfasst meist eine duale Plättchenhemmung per Gabe von oralem oder intravenösem Aspirin und A-P2Y12-Inhibitor Ticagrelor.<sup>7-10</sup> Unfraktionierte Heparine als intravenöser Bolus werden in der Regel zur Antikoagulation eingesetzt.<sup>7-10</sup> Zur Symptomkontrolle werden Morphine und Benzodiazepine verwendet.<sup>9, 10</sup> Indikationsgerecht angewendet können Betablocker, Nitrate, und Sauerstofftherapie Bestandteil der Akuttherapie sein.<sup>9, 10</sup> Statine und ACE Hemmer werden oft zeitnah nach der Reperfusionstherapie eingesetzt.<sup>9, 10</sup> Die langfristige medikamentöse Therapie umfasst normalerweise zudem eine lebenslange Einnahme von Aspirin (75-100 mg), sowie von A-P2Y12-Inhibitoren für 6-12 Monate, abhängig vom Blutungs- und Thromboserisiko.<sup>8-10</sup>

Die Letalität eines akuten Herzinfarkts innerhalb der ersten 28 Tage lag in Deutschland in den Jahren 2016-2018 laut KORA Herzinfarktregister Augsburg des Helmholtz Zentrums München bei 34,5% (Männer, 25-74 Jahre) bis 38,8% (Frauen, 25-74 Jahre),<sup>11</sup> wobei Überlebende eines akuten Myokardinfarkts häufig an Komplikationen wie Herzrhythmusstörungen<sup>12</sup>, Reinfarkten<sup>13</sup>, oder einer Herzinsuffizienz leiden.<sup>14</sup>

## 1.2 Pathophysiologie des akuten Myokardinfarkts

Ein Großteil der akuten Myokardinfarkte ist auf arteriosklerotische Veränderungen der Koronargefäße mit Ruptur einer instabilen Plaque und anschließender Bildung eines Thrombus zurückzuführen.<sup>15</sup> Der Thrombus führt dann in der Regel zu einem Verschluss des arteriellen Herzgefäßes und in der Folge damit zu einem Mangel an Sauerstoff.<sup>15</sup> Durch diesen Sauerstoffmangel stellen Kardiomyozyten ihren Stoffwechsel von einer aeroben Energiegewinnung auf eine anaerobe um.<sup>15</sup> Anstatt Fettsäuren werden unter anaeroben Bedingungen verstärkt Glykogen und Glukose zur ATP Gewinnung benötigt.<sup>15</sup> Die im Verlauf reduzierte ATP-Synthese unter Sauerstoffmangel führt zu einer verminderten Leistung der Na-K-ATPase und letztlich zur Zellschwellung.<sup>15, 16</sup> Ansteigende Kalziumkonzentrationen im Zytosol führen zur Kontraktion von Myofibrillen und Aktivierung von Proteasen wie der Calcium-abhängigen Calpain, welche die Zellwand und das Zytoskelett schädigen.<sup>16</sup> Unter

Sauerstoffmangel akkumuliert Lactat und es kommt zur Absenkung des intrazellulären pH.<sup>15</sup> Entstehende freie Radikale (ROS) reagieren mit freien Fettsäuren und Phospholipiden und führen zur Instabilität der Zellmembran und schließlich zum Zelltod.<sup>15, 16</sup> Nekrose und Apoptose der Kardiomyozyten sind die Folge.

Die Apoptose wird durch diverse Faktoren wie der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration oder dem Energiehaushalt der Zelle beeinflusst.<sup>17</sup> Eine erhöhte Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran führt zur Freisetzung von u.a. Cytochrom C aus den Mitochondrien.<sup>16,</sup> <sup>17</sup> Durch die Ausschüttung von Cytochrom C wird der sogenannte intrinsische Weg der Apoptose aktiviert, hierbei bildet Cytochrom C mit Apaf-1 einen Komplex, der zusammen mit dATP oder ATP die Caspase-9 aktiviert.<sup>18</sup> Caspase 9 wiederum überführt Caspase-3 in einen aktiven Zustand.<sup>18</sup> Caspase-3 führt im Rahmen der Apoptose zu einer Chromatinkondensation und DNA-Fragmentation.<sup>19</sup>

## 1.3 Anpassungsprozess nach akutem Myokardinfarkt

In der akuten Phase eines Myokardinfarkts kommt es durch die Ischämie zu einem nekrotischen und apoptotischen Zelluntergang, welche im Verlauf einen Anpassungsprozess des Herzens hervorruft. Dieser Anpassungsprozess besteht aus einer Frühphase mit Entzündungsreaktion, welche dann in eine nachgeschaltete Phase mit Remodeling des Myokards übergeht.<sup>20</sup>

Während der Phase der Entzündungsreaktion werden einerseits die Zytokinproduktion von Tumornekrosefaktor-a, Interleukin-6 und Interleukin-1 im Infarktareal erhöht, andererseits wandern verschiedener Immunzellpopulationen in das geschädigte Herzgewebe ein.<sup>15, 20</sup> Hierbei migrieren zunächst innerhalb von Stunden neutrophile Granulozyten an die Randgebiete des Infarkts.<sup>15</sup> Im Verlauf wandern weitere Immunzellen wie Mastzellen und Makrophagen nach zwei Tagen, sowie Plasmazellen nach einer Woche ein.<sup>15</sup>

Nach der Phase der Entzündung sammeln sich ab dem vierten Tag nach dem Infarkt Myofibroblasten im Randgebiet des Ischämieareals und ersetzten nach und nach die nekrotischen und phagozytierten Kardiomyozyten durch eine Narbe aus Kollagen.<sup>15</sup> Vermittelt durch VEGF, HIF-1a und iNOS kommt es zur Neoangiogenese in den peripheren Infarktarealen.<sup>20</sup> Die verbliebenen Kardiomyozyten hypertrophieren kompensatorisch, und es kommt zur Proliferation von Myofibroblasten und Progenitorzellen.<sup>20</sup> Nach 4-8 Wochen ist die Defektheilung in der Regel abgeschlossen, wobei es nicht zu einer vollständigen Rekonvaleszenz kommt und ein funktioneller Defekt vorhanden bleibt.<sup>15, 20</sup>

Neben dem akuten Funktionsverlust kann ein akuter Myokardinfarkt langfristig zur Herzinsuffizienz führen.<sup>21</sup> Um Folgeschäden wie die Herzinsuffizienz zu beeinflussen ist es

wichtig, therapeutische Strategien zu entwickeln, die einerseits das akute Infarktausmaß reduzieren, und/oder andererseits die adaptiven Prozesse in Form des Remodelings optimieren.

## 1.4 Myokardinfarkt und IGF-1; epidemiologische Aspekte

Ein endogener Faktor, welcher einen Einfluss auf die Entstehung, das Ausmaß sowie die Folgen eines Myokardinfarktes haben kann, ist der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor 1 (IGF-1). So konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer Hypophyseninsuffizienz eine erhöhte Mortalität aufgrund kardiovaskulärer Ereignisse haben.<sup>22</sup> Juul und Kollegen zeigten im Jahr 2001, dass eine inverse Korrelation zwischen IGF-1 Spiegel und dem Risiko auf die Entwicklung einer ischämischen Herzerkrankung besteht.<sup>23</sup>

Neben diesen Hinweisen, dass IGF-1 Spiegel eine Bedeutung für die Entwicklung einer kardiovaskulären Erkrankung haben, deuten weitere epidemiologische Daten auf eine kardioprotektive Bedeutung von IGF-1 bei bestehendem Myokardinfarkt hin. In einer klinischen Untersuchung von Yamaguchi et al (2008) fiel eine Korrelation zwischen der IGF-1 Konzentration im Blutserum und der Mortalität nach einem Herzinfarkt auf, wobei Patienten mit niedriger IGF-1 Serumkonzentration eine signifikant höhere Mortalität innerhalb der ersten 90 Tage nach dem akutem Herzinfarkt aufwiesen als Patienten mit höheren IGF-1 Serumkonzentration.<sup>24</sup> In einer klinischen Studie von Bourron und Kollegen konnte gezeigt werden, dass die Patienten, deren IGF-1 Spiegel zum Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme wegen eines akuten Myokardinfarktes im untersten Quartil lagen, ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Myokardinfarkt-bedingten Todes, eines erneuten Myokardinfarkts oder eines Schlaganfalls in einem Beobachtungszeitraum von zwei Jahren hatten.<sup>25</sup>

Zusammenfassend deuten diese epidemiologischen Daten auf eine kardioprotektive Wirkung des IGF-1 am Menschen hin, wobei IGF-1 sowohl Inzidenz senkt, einen Herzinfarkt zu erleiden, als auch die Mortalität und/oder Morbidität nach Herzinfarkt verringert.

### 1.5 Physiologische Aspekte des IGF-1

Der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor existiert in zwei Isoformen, dem zuvor genannten IGF-1 sowie dem IGF-2.<sup>26</sup> IGF-1 und IGF-2 sind Liganden am IGF-1-Rezeptor bzw. IGF-2-Rezeptor, wobei IGF-1 eine hohe Affinität zum IGF-1-Rezeptor aufweist, und IGF-2 zum IGF-2-Rezeptor.<sup>26</sup> Wegen der zuvor beschriebenen kardioprotektiven Bedeutung des IGF-1 liegt der Fokus dieser Arbeit auf der IGF-1-Isoform.

Das reife IGF-1 besteht aus 70 Aminosäuren, wobei es aus Vorläuferpeptiden, dem Prä-Pro-IGF-1 und dem Pro-IGF-1 gebildet wird.<sup>27</sup> Das Prä-Pro-IGF-1 ist dadurch gekennzeichnet, dass es am N-terminalen Ende ein Signalpeptid sowie am C-terminalen Ende ein E-Peptid besitzt (Abb. 1).<sup>27</sup> Nach Abspaltung des N-terminalen Signalpeptids entsteht das Pro-IGF-1 und anschließend das reife IGF-1 nach Abspaltung des C-terminalen E-Peptids.<sup>27</sup> Beim Menschen gibt es verschiedene Varianten des C-terminalen E-Peptids, Ea, Eb, und Ec, die durch alternatives Splicing entstehen.<sup>27</sup>



**Abb. 1 Darstellung der Vorläuferpeptide von IGF-1 und Ea-Peptid** modifiziert nach Brisson und Barton<sup>27</sup>: Dargestellt sind die Vorläuferpeptide A) Pro-Prä-IGF-1, B) Pro-IGF-1 nach Abspaltung des Signalpeptids, das C) reife IGF-1 und das E-Peptid.

Während der embryonalen Entwicklung nimmt IGF-1 eine zentrale Rolle ein. So zeigen entsprechende Knockout-Mäuse eine unzureichende Lungenentwicklung, mit der Folge respiratorischer Probleme nach der Geburt, sowie ein erniedrigtes Geburtsgewicht verglichen mit der Kontrollgruppe.<sup>28</sup>

Beim Menschen ändert sich die IGF-1 Serumkonzentration im Verlauf des Lebens entsprechend der Sekretion von Wachstumshormon (growth hormone, GH), welche in der Kindheit niedrig ist, zur Pubertät ihr Maximum erreicht, und mit zunehmendem Alter wieder abfällt.<sup>29, 30</sup> Die Hypophyse sezerniert GH und kontrolliert damit die Bildung von IGF-1, welche zu circa 70 % in der Leber stattfindet.<sup>31, 32</sup> Der Transport von IGF-1 im Blut erfolgt größtenteils durch Bindung an ein IGF-bindendes-Protein (IGFBP).<sup>33</sup> Zusätzlich wird IGF-1 auch in diversen Geweben produziert und wirkt dort para- und autokrin.<sup>31</sup>

IGF-1 spielt eine Rolle für das Zellwachstum, -proliferation, und -überleben.<sup>26</sup> Auf Kardiomyozyten wirkt IGF-1 antiapoptotisch und inhibiert die Autophagie.<sup>34</sup> Zudem kann IGF-1, wenn auch mit geringer Affinität, an Insulinrezeptoren binden, und hierdurch über eine Steigerung der Glukoseaufnahme Einfluss auf den zellulären Metabolismus nehmen, sowie die Proteinsynthese verstärken.<sup>34</sup> IGF führt *in vitro* bei kultivierten Rattenkardiomyozyten zur Hypertrophie über eine verstärkte Synthese von Proteinen wie Myosin-leichte-Kette-2 und Troponin I.<sup>35</sup> Neben *in vitro* Untersuchungen existieren auch *in vivo* Studien, die einen anabolen Effekt von IGF-1 zeigen. Beispielsweise zeigt eine experimentelle Studie von Delaughter et al an transgenen Mäusen mit Überexpression von parakrin (lokal) wirkendem IGF-1 in den

Kardiomyozyten eine kardiale Hypertrophie.<sup>36</sup> In Zellkulturversuchen wurde auch eine Steigerung der DNA Synthese und Zellproliferation kardialer Myozyten durch IGF-1 beschrieben.<sup>37</sup> Zudem gibt es Hinweise, dass IGF-1 als endogener parakriner Faktor einen regulatorischen Einfluss auf kardiale Progenitorzellen im Rahmen der Heilung nach einem Infarktschaden besitzen könnte.<sup>34</sup>

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass IGF-1 am Herzen eine zentrale Rolle als Wachstumsund Überlebensfaktor im Rahmen verschiedener physiologischer und pathophysiologischer Prozesse zukommt.



#### 1.6 Intrazelluläre Signalwege IGF-1

Abb. 2 modifiziert nach Siddle et al (2012)<sup>38</sup>: **Darstellung des intrazellulären Signalwegs von IGF-1** nach Bindung an den IGF-1 Rezeptor. Dargestellt sind die beiden Hauptsignalwege PI3K/AKT, Ras/ERK und die über die Signalwege vermittelten Effekte.

IGF-1 hat über verschiedene intrazelluläre Signalwege Einfluss auf diverse zelluläre Prozesse. In Abbildung 2 sind die wichtigsten Signalwege und deren physiologische Bedeutung schematisch dargestellt.

IGF-1 bindet an und wirkt über den IGF-1-Rezeptor.<sup>39</sup> Der IGF-1 Rezeptor gehört zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen und besteht aus zwei Homodimeren mit jeweils einer  $\alpha$  und einer  $\beta$  Untereinheit, welche über eine Disulfidbrücke verbunden sind.<sup>39</sup> Die Dimere bestehen aus einem extrazellulären, einem membranständigen und einem intrazellulären Anteil.<sup>39</sup> Der intrazelluläre Anteil fungiert als Tyrosinkinase.<sup>39</sup> Die Homodimere verbinden sich über Disulfidbrücken der α-Untereinheiten zum vollständigen IGF-1 Rezeptor.<sup>39</sup> Jede der αβ-Dimere besitzt zwei Bindungsstellen für IGF-1.<sup>39</sup> Die Bindung von IGF-1 an den dimeren IGF-1 Rezeptor führt zur Autophosphorylierung an sechs Tyrosin-Phosphorylierungsstellen innerhalb der Kinase-Domäne der β-Untereinheit.<sup>38</sup> Der autophosphorylierte IGF-1-Rezeptor aktiviert hauptsächlich zwei intrazelluläre Signalwege, den Ras/MAP-Kinase Signalweg sowie den PI3K/AKT Signalweg.<sup>38</sup>

An den autophosphorylierten IGF-1 Rezeptor binden über eine Phosphotyrosin-binding (PTB) Domäne Insulin Rezeptor Substrat 1 und 2 (IRS 1; IRS 2) und Src homology 2 domain containing transforming protein (Shc), woraufhin IRS 1, IRS 2 und Shc an verschiedenen Tyrosinresten phosphoryliert werden.<sup>40</sup>

#### Ras/MAP-Kinase Signalweg:

Die Aktivierung des Ras-MAPK Signalweges erfolgt dann über Src homology 2 (SH2) und Growth factor receptor-bound 2 (GRB2).<sup>40</sup> Die Proteine mTORC1 und S6 regulieren über die Phosphorylierung von IRS die IGF-1 Signalwirkung, indem sie zur Modulation der Funktion oder Degradierung von IRS führen.<sup>40</sup>

Nach Bindung von Growth factor receptor-bound 2 (GRB2) an IRS 1, IRS 2 oder Shc bindet GRB2 über eine SH3 Domäne an Son of Sevenless (SOS).<sup>40</sup> SOS aktiviert darauf die GTPase Ras. Ras wiederum aktiviert Raf, welche MEK phosphoryliert und aktiviert, diese stimuliert die MAP-Kinase ERK.<sup>40</sup> Der sogenannte Ras/Raf/MAP-Kinase Signalweg führt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren.<sup>40</sup> Unter anderem wird Phospholipase Cβ1 (PLCβ) MAPK-abhängig im Nukleus aktiviert, welche eine Bedeutung für im Rahmen von Zellproliferation und -differenzierung hat.<sup>40</sup> Der MAP-Kinase Signalweg beeinflusst zudem DNA Synthese und Zellüberleben.<sup>40</sup>

### Der PI3/AKT Signalweg:

Der PI3 Kinase Signalweg wird aktiviert durch eine Interaktion zwischen dem IGF-1-Rezeptor/IRS-Komplex und der 85 kD Untereinheit der PI3-Kinase.<sup>40</sup> Die so aktivierte PI3K setzt Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP2) in Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat (PIP3) um.<sup>41</sup> Das so entstandene PIP3 aktiviert die Phosphoinositide-dependent Kinase (PDK).<sup>40</sup> PDK wiederum phosphoryliert die AKT Kinase (auch: Proteinkinase B) am Threonin 308.<sup>40</sup> Mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) ist ein Proteinkomplex aus sieben Untereinheiten, welcher AKT am Serin 473 phosphoryliert, was dann zu einer vollständigen Aktivierung von AKT führt.<sup>40</sup> Über die AKT-Wirkung nimmt IGF-1 Einfluss auf den zellulären Metabolismus, das Zellwachstum und -zyklus und das Überleben der Zellen. Der AKT Signalweg beeinflusst den Metabolismus, indem es die Glukoseaufnahme über den Einbau von GLUT 4 über Phosphorylierung von AS160 steigert, und die Glykogensynthese über die Phosphorylierung von Glykogen Synthase Kinase 3ß (GSK3ß) stimuliert.<sup>40</sup> AKT führt zur Aktivierung von mTOR1, welches eine Schlüsselrolle in der Regulation des Zellwachstums einnimmt. mTOR1 inhibierende Proteine wie Tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) werden inhibiert.<sup>42</sup> Aktiviertes mTOR1 führt ebenfalls zu einer erhöhten Transkription des Glukosetransporters GLUT 1 und Einbau von Aminosäuretransportern in die Zellmembran.<sup>42</sup> Des Weiteren werden antiapoptotische Effekte über eine Inhibierung von Procaspase 9 und Bad vermittelt, und durch Inhibierung von cyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren p27 und p21 wird die Zellteilung stimuliert.<sup>42</sup> Die Inhibierung der GSK3 führt zur Stabilisierung von Cyclin D, Cyclin E, sowie der Transkriptionsfaktoren c-jun und c-myc, welche am Übergang von der Zellteilungsphase G1 zur S Phase beteiligt sind.<sup>42</sup> Phosphorylierung und Inhibierung von Forkhead box-containing Proteinen (FOXO) beeinflussen die Transkription von Genen, die Einfluss auf Apoptose, den Zellzyklus, oder den Metabolismus haben.<sup>42</sup>

Zusammenfassend kann der PI3/AKT Signalweg als anaboler und antiapoptotischer Signalweg angesehen werden.

## 1.7 IGF-1 und das Ea-Peptid

Wie zuvor beschrieben entsteht das reife IGF-1 aus Vorläuferpeptiden unter Abspaltung von E-Peptiden. Für das Ea-Peptid gibt Hinweise, dass ihm eine eigene biologische Bedeutung zukommen könnte. So konnte gezeigt werden, dass das Ea-Peptid wichtig für die hypertrophierende Wirkung von IGF-1 an Skelettmuskelzellen ist.<sup>27</sup> Transgene Mäuse mit einer muskelspezifischen Überexpression des IGF-Ea-Peptids bilden eine Hypertrophie der Skelettmuskultur im Vergleich zur Kontrollgruppe mit alleiniger Expression von IGF-1, ohne das Ea Peptid, aus.<sup>27</sup>

Des Weiteren zeigen Zellkulturexperimente, dass das Ea-Peptid sowohl die Aktivierung, als auch die intrazelluläre Signalwirkung des IGF-1-Rezeptors modulieren kann. Das Ea-Peptid führte *in vitro* an Myoblasten zu einer 30-40% stärkeren Aktivierung des IGF-1 Rezeptors durch IGF-1 und zudem zu einer Verschiebung der intrazellulären Signalwirkung hin zum MAP-Kinase (= ERK) Signalweg im Vergleich zu IGF-1 ohne Ea-Peptid.<sup>27</sup> Interessanterweise zeigte sich ein Hinweis auf eine eigene biologische Aktivität des Ea-Peptids. So führte Ea unabhängig von IGF-1 *in vitro* zu einer transienten Erhöhung der ERK 1/2 Phosphorylierung zwischen Minute 15 und 30 nach Behandlung.<sup>43</sup> Allerdings konnte keine Rezeptorinteraktion

nachgewiesen werden, und der genaue Wirkmechanismus bleibt unklar. Als weiterer Effekt des Ea-Peptids wurde eine Steigerung der Anzahl der verfügbaren IGF-1-Rezeptoren auf der Zelloberfläche im Vergleich mit IGF-1 alleine beschrieben.<sup>43</sup> Die erhöhte Bioverfügbarkeit des IGF-1 Rezeptors durch das Ea-Peptid könnte zur Verstärkung der IGF-1 Signalwirkung durch das Ea-Peptid führen.<sup>43</sup>

#### **1.8 IGF-1 und Myokardinfarkt: Experimentelle Daten**

Neben den zuvor beschriebenen epidemiologischen Daten zu IGF-1 existieren zahlreiche experimentelle Untersuchungen zur IGF-1 Wirkung im isolierten Herzmodell oder *in vivo* Tiermodell mit Myokardinfarkt.

In einer Untersuchung von Reiss et al. stieg in Rattenherzen nach Infarkt mittels Ligatur der linken Koronararterie die Konzentration an IGF-1 und IGF-1-Rezeptor mRNA im Herzgewebe in den überlebenden Kardiomyozyten, was auf eine Bedeutung von IGF-1 nach Myokardinfarkt hindeuten könnte.<sup>44</sup>

Yamamura et al (2001) zeigten an isolierten Rattenherzen eine antiapoptotische Wirkung von IGF-1 über Bcl-xL Aktivierung und Bax Hemmung, diese beiden sind wichtig für die Regulation der Apoptose durch Mitochondrien mit konsekutiv erniedrigter Cytochrom C Freisetzung. Hierbei wurden Rattenherzen 24 h vor der globalen Ischämie, welche im isolierten Herzmodel durchgeführt wurde, mit IGF-1 behandelt. Diese Behandlung führte zu einer höheren postischämischen ATP-Synthese, und die Herzen zeigten eine verbesserte linksventrikuläre Funktion sowie eine erniedrigte Freisetzung von Kreatinkinase nach 25-minütiger globaler Ischämie im Vergleich zur Kontrollgruppe.<sup>45</sup>

Zudem gibt es weitere Hinweise aus tierexperimentellen Studien, dass IGF-1 ein kardioprotektives Potential besitzt.<sup>46</sup> So führte eine IGF-1 Gabe in Mäuseherzen nach 20minütiger Ischämie im isolierten Herzmodell zu einer Reduktion der interstitiellen Ödembildung und des Myokardschadens, sowie zu einer Verbesserung der kardialen Pumpfunktion während der Reperfusion.<sup>46</sup>

Buerke et al (1995) zeigten einen kardioprotektiven Effekt von IGF-1 in einem *in vivo* Rattenmodel mit myokardialer Ischämie und Reperfusion.<sup>47</sup> Hierbei führte eine IGF-1-Gabe zu einer Reduktion des Myokardschadens und einer verringerten kardiomyozytären Apoptoserate.<sup>47</sup> In einer weiteren Studie zeigten Santini et al (2007) ebenfalls einen kardioprotektiven Effekt von IGF-1 in einem Mausmodell. Hierbei wurden transgene Mäuse mit einer kardialen Überexpression des IGF-1-Ea Propeptids verwendet.<sup>48</sup> Nach Ligatur der linken Koronararterie zeigte sich eine positive Beeinflussung des kardialen Remodelings,

wobei die Einschränkung der Herzfunktion nach dem Myokardinfarkt in den transgenen Tieren im Vergleich zu wildtypischen Kontrollmäusen deutlich reduziert war.<sup>48</sup> Auch wenn in dieser Studie ein enormes Ausmaß des Funktionserhalts in der IGF-1 Überexpressionsgruppe nachgewiesen werden konnte, so blieb jedoch unklar, ob dieser Funktionserhalt alleine auf das reife IGF-1 oder aber auf das Ea-Peptid, welches möglicherweise eine eigene biologische Wirksamkeit hat oder die IGF-1 Effekte moduliert, zurückzuführen war.

#### 1.9 Ableitung der Fragestellung – Ziele der Arbeit

Zusammenfassend zeigt sich deutlich, dass IGF-1 eine kardioprotektive Wirkung im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes sowie des hierdurch bedingten kardialen Remodelings hat. Dieser protektive Effekt wurde besonders deutlich in einem Mausmodell mit kardialer Überexpression des IGF-Ea Peptids nachgewiesen.<sup>48</sup>

Da es Hinweise sowohl auf eine eigene biologische Wirksamkeit des Ea-Peptids als auch auf eine die IGF-1 Signalkaskade modulierende Funktion des Ea-Peptids gibt,<sup>27</sup> stellt sich die Frage, ob der bei Santini et al. gezeigte, protektive Effekt der IGF-Ea Überexpression alleine durch das IGF-1 hervorgerufen wird, oder ob dem Ea-Peptid eine biologische Bedeutung zukommt.

Mechanistisch wäre der langfristige Erhalt der kardialen Pumpfunktion sowohl durch eine Reduktion des akuten Ischämie- und Reperfusionsschadens, als auch über eine Beeinflussung des kardialen Remodelings in der subakuten und chronischen Phase nach dem Infarktereignis erklärbar. Da in der Arbeit von Santini et al. mit einem Mausmodell mit permanenter Überexpression des IGF-1-Ea Peptids gearbeitet wurde, ergeben sich aus dieser Arbeit keine Hinweise darauf, ob der protektive Effekt durch eine Reduktion des akuten I/R Schadens hervorgerufen wurde, oder aber auf eine Modulation des kardialen Remodelingprozesses zurückzuführen war. In der vorliegenden Arbeit soll vor diesem Hintergrund untersucht werden, ob das Ea-Peptid eine direkte oder eine den IGF-1 Effekt-modulierende Wirkung auf den akuten Myokardschaden hat.

Somit sollen folgende Fragestellungen in dieser Dissertation beantwortet werden:

- 1. Moduliert das Ea-Peptid die IGF-1 Signalkaskade im isolierten, perfundierten Herzen?
- 2. Haben IGF-1 oder das Ea-Peptid einen Einfluss auf den akuten Myokardschaden nach akutem Herzinfarkt im isolierten, perfundierten Herzen?

## 2 Material und Methoden

## 2.1 Verwendete Laborgeräte

- Apparatus Isolated Heart, Size:1, Type 844, Hugo Sachs
- Binokular, Wild M3B, Leica
- Centrifuge 5417 R, Eppendorf
- Digital pH-Meter, Knick
- Digital Thermometer, Greisinger Electronic
- Druckwandler Combitrans 3, B.Braun
- Elektrophoresekammer SE 600 Ruby, Amersham Biosciences
- Elisa-Reader, SpectraCount, Packard
- Externes Modul PowerLab 4/25, ADInstruments
- Feinspritze REV F, Hamilton
- Feinwaage Type 1801, Sartorius
- Filteranlage für Flüssigkeiten mit Unterdruckpumpe, Milipore
- Gefrierschrank -80 Grad Celsius, Revco
- Gefrierschrank -20 Grad Celsius, Privileg
- Heizstab mit Wasserkreislauf T U1.38, Lauda
- Infinite M200 Pro, Tecan
- Infrared Imager, Odyssey
- Inputmodul Plugsys mainframe bench model Type: 600, Hugo Sachs
- Magnetrührer MR3001, Heidolph
- Photometer SpectraCount, Packard
- Pierce G2 Fast Blotter, Thermo Fisher Scientific
- Pressure Calibrator, Hugo Sachs
- PC, Avistron
- Spannungsgerät Power 608, Thermo Fisher Scientific
- Spritzenpumpe Pump 11 Elite, Harvard Apparatus
- Thermomixer comfort, Eppendorf
- Gewebehomogenisator Tissue Ruptor, Qiagen
- Ultrasonic Flowmeter, Hugo Sachs
- Vortexer, Scientific Industries
- Wasserreinigung Milli-Q plus, Millipore

## 2.2 Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Gele und Puffer

## 2.2.1 Langendorff-Modell

Chemikalien:

Carbogen (Linde), Heparin 25000 IE (Ratiopharm), NaCl (Sigma), KCl (Sigma), MgSO2\*7H2O (Sigma), KH2PO4 (Sigma), NaHCO3 (Roth), EDTA (Sigma); CaCl2\*H2O (Sigma), Glukose\*H2O (Sigma), Lactat (Sigma), Pyruvat (Sigma)

Puffer:

Krebs-Henseleit Puffer: 118 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 1,2 mM MgSO<sub>2</sub>\*7H<sub>2</sub>O; 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>; 0,5 mM EDTA; 2,25 mM CaCl<sub>2</sub>\*H<sub>2</sub>O; 8,32 mM Glucose\*H<sub>2</sub>O; 1 mM Lactat; 0,1 mM Pyruvat

## 2.2.2 Western Blot

Gele:

Sammelgel, SDS-Acrylamid-Gel 40% Acrylamidlösung: 14,8 ml dH<sub>2</sub>O; 2,5 ml Acrylamid
40%; 2,5 ml 1 M Tris (pH 6,8); 0,2 ml SDS 10%; 40 µl TEMED; 60 µl APS 10%

- Trenngel, SDS-Acrylamid-Gel 40% Acrylamidlösung: 20 ml H<sub>2</sub>O; 10 ml Acrylamid 40%; 10 ml 1,5 M Tris (pH 6,8); 0,4 ml SDS 10%; 80 µl TEMED; 100 µl APS 10%

## Puffer:

- Anodenpuffer: 300 mM Tris, 100 mM Tricin (pH 8,8)

- Kaliumphosphatpuffer: 0,5 M KH2PO4 (pH 7,5)

- Kathodenpuffer: 300 mM Aminocapronsäure, 30 mM Tris (pH 8,7)

- Kinase-Lysis-Puffer: 25 ml 20% Triton-X-100; 10 ml NoPi (pH 8,0); 15 ml 5 M NaCl; 10 ml 250 mM EDTA, add ddH20 bis 500 ml

- Lämmli-Puffer (4-fach): 12,5 ml Tris (pH 6,8); 10 ml Glycerin; Bromphenolblau 5 μg; 20 ml SDS 20%; bei Zusatz von Dithiothreitol Verhältnis 10:1

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS): 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na2HPO4\*2H2O; 1,76 mM KH2PO4 (pH 7,4)

- SDS-Page-Laufpuffer: 30 g Tris; 144 g Glycin; 10 g SDS; add 1000 ml dH20

- Tris-Puffer (TBS, einfach) mit Tween 0,1%: 2,42 g Tris; 8 g NaCl (pH 7,4); 5 ml Tween 20; add 1000 ml dH<sub>2</sub>0

- Tris-Puffer (TBS, einfach): 2,42 g Tris; 8 g NaCl (pH 7,4); add 1000ml dH<sub>2</sub>0

Reagenzien:

- Blocking Buffer (PBS), Odyssey Li-Cor Biosiences

- Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific: Reagent B, Reagent A, Albumin Standard

- Prestained Proteins PageRuler #26616, Thermo Fisher Scientific

- Protease und Phosphatase Inhibitormix, Thermo Fisher Scientific

## 2.2.3 LDH Assay

Herstellung des Reaktionsmediums:

- NADH-Lösung: 40 mL 0,5M Kaliumphosphat-Puffer; 500 μl 10% Triton X-100; 18 mg NADH; add 140 ml ddH<sub>2</sub>O

- Pyruvat-Lösung: 13,75 mg Pyruvat (0,625 mMol); add 20 ml ddH<sub>2</sub>O

- Reaktionsmedium (Erwärmung auf 25 Grad Celsius): 30 ml NADH-Lösung; 3,3 ml Pyruvat-Lösung

## 2.3 Antikörper für die Western Blots

Primäre Antikörper:

- panAKT Maus #2920 (1:1000), Cell Signaling

- pAKT-Serin 473 #9271 (1:1000), Cell Signaling

- ERK 1/2 Maus #9107 (1:1000), Cell Signaling

- pERK 1/2 (Thr202/Tyr204) #4370 (1:1000), Cell Signaling

- pAKT-Threonin 308 #4059 (1:1000), Cell Signaling

- AKT1 #2967 (1:1000), Cell Signaling

- pAKT1 (Ser473) #9018 (1:1000), Cell Signaling

- AKT2 #5239 (1:1000), Cell Signaling

- pAKT2 (Ser474) #8599 (1:1000), Cell Signaling

- GSK Kaninchen (grün) #12456 (1:1000), Cell Signaling

- pGSK-3ß (Ser9) Maus (rot) #14630 (1:1000), Cell Signaling

Sekundäre Antikörper:

- Maus rot: Goat anti-Mouse IRDye 680RD 0,5 mg (1:10000) 926-68070, Li-Cor Biosiences

- Kaninchen grün: Goat anti-Rabbit IRDye 800CW 0,5 mg (1:10000) 926-32211, Li-Cor Biosiences

## 2.4 Verwendete Peptide

- Bovines Serumalbumin (BSA), Merck

- Human IGF-1, 1000 µg, MW 7,7 g/mol, Nr.: 130-093-887, Miltenylbiotec

- Tat-Ea Peptid, MW 5,689 g/mol – Aminosäuresequenz: H-GRKKRRQRRPQRSIRAQRHTDM-PKTQKEVHLKNTSRGSAGNKTYRM-OH, *Batch*. *No*: 070415A2, JPT

Das mit dem Ea-Peptid konjugierte Tat-Peptid dient der Erhöhung der Bioverfügbarkeit des Ea-Peptids, indem es die Penetration der Zellmembran verbessert.<sup>49</sup> Im weiteren Verlauf der Arbeit wird von Ea-Peptid gesprochen.

## 2.5 Mausstamm

Die Mäuse des Stamms C57BL/6J wurden durch das Zuchtunternehmen Janvier Labs an die Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) in Düsseldorf angeliefert. Für die Versuche wurden männliche Mäuse zwischen 20-25 g verwendet. Die Organentnahme war unter der Projektnummer O16/04 genehmigt.

#### 2.6 Das isolierte Herzmodell nach Langendorff

#### 2.6.1 Aufbau für druckkonstante Perfusion des Herzens



**Abb. 3: Skizze der Langendorff Anlage.** In einem Glasgefäß wird der Krebs-Henseleit Puffer (KH-Puffer; 37 °C) wird mit Carbogen begast, wobei ein Druck von 80 mmHg im Gefäß entsteht, da überschüssiges Gas über eine Wassersäule entsprechender Höhe abgeleitet wird. Dieser Druck stellt die treibende Kraft für den Perfusatfluss am Herzen in der Langendorff-Anlage dar. Ebenfalls dargestellt ist ein Druckabnehmer mit Ballonkatheter im linken Ventrikel des schlagenden Herzens.

Die Langendorff Anlage besaß ein Wasserbad samt Heizelement inklusive Pump- und Umwälzfunktion. Die Betriebstemperatur des Wasserbads wurde so gewählt, dass die Temperatur am Herzen 37 °C betrug. In dem Wasserbad stand eine 2 Liter Flasche mit Krebs-Henseleit Puffer, welche luftdicht verschlossen war. Der Krebs-Henseleit Puffer wurde mit Carbogen begast, wodurch ein Druck innerhalb der 2 Liter Flasche und damit ein Perfusionsdruck am Herzen innerhalb der Langendorff-Anlage erzeugt wurde. Überschüssiges Gas wurde über eine Wassersäule abgegeben. Die Füllhöhe der Wassersäule regulierte den Druck innerhalb der Langendorff-Anlage. In unserem Modell wurde ein Perfusionsdruck von 80 mmHg am Herzen eingestellt.

Die Herzen wurden mit 37 °C warmen Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert, wobei die Stromstärke der Perfusion durch einem dem Herzen vorgeschalteten Flussmesser aufgezeichnet

wurde. Um eine Auskühlung des Herzens zu verhindern, hing das Herz in einer abgeschlossenen Wärmekammer, welche mit dem Wasserbad verbunden war.



Abb. 4: Langendorff-Anlage samt Wärmemantel links, worin das isolierte Herz aufgehängt wird. Rechts das Wasserbad mit der das Perfusat-enthaltenden Glasflasche.

## 2.6.2 Vorbereitung der Versuchstiere

Nach Anlieferung der Mäuse vom Zuchtunternehmen an die ZETT wurden die Mäuse für mindestens 7 Tage dort unter Standardbedingungen gehalten, um eine Akklimatisierung und Stressreduktion zu erreichen. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

## 2.6.3 Exzision, Präparation und Aufhängen des Mäuseherzens

15 Minuten nach intraperitonealer Heparingabe (50 I.E.) wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Im Anschluss wurde der Brustkorb eröffnet und das Herz samt Lungen entnommen und in eisgekühltes PBS gegeben.

In einer Petrischale wurde die Aorta aufgesucht und proximal der brachiocephalen Abgänge quer durchtrennt. Im Anschluss wurde die Aorta mit einer mit Krebs-Henseleit-Puffer gefüllten Kanüle kanüliert und mit einem Faden auf der Kanüle fixiert. Zuletzt wurde das Herz samt Kanüle an die Langendorff Anlage überführt und mit KH-Puffer perfundiert.

Der Vorgang dauerte in der Regel zwischen 3-4 Minuten; bei einer Präparationszeit über 5 Minuten wurde das Herz nicht in die Studie aufgenommen. Nachdem das Herz in die Langendorff Anlage eingehängt wurde, wurde überschüssiges Gewebe wie Lungenanteile, Thymusreste, das linke Herzohr oder überschüssige Gefäßanteile mit einer Präparierschere entfernt. Zudem wurde ein zweiter Faden in die übrige Einkerbung der Kanüle gelegt, um die Verbindung zwischen Herzen und Kanüle gegen den Austritt von Krebs-Henseleit-Puffer zu sichern.

## 2.6.4 Platzierung des Ballonkatheters

Nachdem das linke Herzohr entfernt wurde, konnte ein Ballonkatheter über die Mitralklappe in den linken Ventrikel eingeführt werden. Der Ballon wurde über ein Dreiwegehahnsystem mittels Feindosierspritze soweit mit H<sub>2</sub>O gefüllt, sodass nach der Einschlagphase der enddiastolische Ventrikeldruck 5 mmHg betrug.

## 2.6.5 Herstellung des Ballonkatheters

Der Ballonkatheter wurde aus einem PE-Schlauch und Küchenfolie selber hergestellt. Die Faltung der Folie erfolgte wie in der Abbildung 5 beschrieben. Der Knoten wurde hier 4 mm vor dem Schlauchende gesetzt. Damit der Ballonkatheter luftfrei war, wurde vorher der Schlauch mit doppelt destilliertem Wasser befüllt und das Schlauchende in einen Wassertropfen auf die Folie gelegt.



Abb. 5: Herstellung des Ballonkatheters. Links: Faltschema. Mitte: Bild vom fertig gefalteten und geknoteten Ballonkatheter, die überstehenden Folienreste werden mit einer Präparierschere entfernt. Rechts: Isoliertes, perfundiertes Herz innerhalb des Wärmemantels mit Ballonkatheter im linken Ventrikel, dahinter die Stahlkanüle, an welche die Aorta bzw. das Herz mit zwei Fäden fixiert ist.

Im Anschluss wurde der wassergefüllte Ballon auf ein Volumen von ungefähr 80-100 µl gedehnt, damit er als Ballonkatheter verwendet werden konnte. Überschüssige Folienreste und Fadenreste wurden mit einer Feinschere entfernt.

Der Ballonkatheter wurde regelmäßig auf die Steifheit und Dichtigkeit geprüft. Hierzu wurde der Ballon mit 40 µl H<sub>2</sub>O gefüllt, der Druck im Ballon wurde gemessen und durfte 2 mmHg nicht übersteigen. Bei erhöhtem Druck oder Flüssigkeitsaustritt wurde der Ballon verworfen.

#### 2.6.6 Messinstrumente, Aufzeichnung der Messwerte und Eichen

Der sich im linken Ventrikel befindende Ballonkatheter wurde durch die Kontraktion des Herzens komprimiert, wobei der sich verändernde Druck über das Schlauchsystem an einen Druckwandler weitergeleitet wurde. Der Druckwandler erzeugte elektrische Impulse, welche verstärkt wurden (Plugsys mainframe bench model, Hugo Sachs) und an das Datenerfassungssystem PowerLab 4/25 (ADInstruments) weitergeleitet wurden. Die Datenaufzeichnung und -auswertung erfolgte mit Hilfe der Software LabChart 7.

Zusätzlich wurde der koronare Perfusionsdruck über einen zweiten Druckwandler erfasst und aufgezeichnet. Vor Versuchsbeginn wurden die Drucksignale mit Hilfe einer Druckeichsäule nach Gauer geeicht.

Zur Messung der Koronarflusses wurde eine Flussmesssonde (Transit-time Ultrasonic Flowmeter; Hugo Sachs) verwendet, welche die Laufzeit eines Ultraschallsignals innerhalb der durchströmenden Flüssigkeit registriert. In unserem Aufbau war eine Messgenauigkeit von 0,01 ml/min möglich. Die Datenerfassung und -verarbeitung erfolgte ebenfalls über das PowerLab 4/25 bzw. die LabChart 7 Software. Eine Eichung der Flusswerte erfolgte vor Versuchsbeginn durch Abmessung des durchströmenden Volumens pro Zeit, hierbei wurde ein 30 Sekunden-Zeitraum gewählt. Entsprechend wurde der Fluss komplett unterbrochen und das Signal des Nullflusses ebenfalls dem 0-Wert im LabChart zugewiesen.

## 2.6.7 Zeitliche Abfolge: Aufhänge- und Einschlagphase

Der Zeitraum von der Überführung des kanülierten Herzens an die Langendorff-Anlage und dem Start der Perfusion bis zum Abschluss der Präparation inklusive der Platzierung der Ballonkatheters im linken Ventrikel wird im Folgenden als Aufhängephase bezeichnet und dauerte maximal 10 Minuten. Nach Abschluss der Aufhängephase folgte eine 50 minütige Stabilisierungsphase, um die Einflüsse der Exzision, des Aufhängens und der Platzierung des Ballonkatheters zu reduzieren. Diese Phase wird im Folgenden als Einschlagphase bezeichnet.

#### 2.6.8 Physiologische Parameter des isolierten Herzens

Herzen, welche zum Ende der Einschlagphase einen koronaren Fluss > 15 ml/min/g, einen endsystolischen Druck < 70 mmHg, ein dP/dt max < 3.000 mmHg/s oder eine Herzfrequenz < 300 Schläge pro min aufwiesen wurden nicht in die Versuchsreihen aufgenommen.

#### 2.6.9 Applikation von IGF-1, Ea, IGF-1+Ea oder Vehikel

Die Applikation der Substanzen und des Vehikels erfolgte über eine flussgesteuerte Injektion in das Perfusionssystem unmittelbar proximal des Herzens. Die Infusionsrate der Feinpumpe betrug 1/100 der gemessenen Koronarperfusion. Die Konzentration der applizierten Substanzen war jeweils um den Faktor 100 höher als die gewünschte Konzentration im Herzen, sodass durch die gewählte Infusionsrate von 1/100 der Koronarperfusion die finale Konzentration erzielt wurde. Die im weiteren Verlauf dieser Dissertation genannten Konzentrationen bezeichnen die Konzentrationen am Herzen.

#### 2.6.10 Versuchsprotokolle

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden in drei experimentellen Serien durchgeführt. Das Ziel der ersten Versuchsserie war die Findung einer wirksamen IGF-1 Konzentration, welche durch Erstellung einer IGF-1 Dosis-Wirkungskurve ermittelt wurde. In der zweiten Versuchsserie wurde untersucht, ob das Ea-Peptid durch IGF-1 aktivierte Signalwege moduliert bzw. ob es eine eigene biologische Aktivität auf die untersuchten Signalwege zeigt. Das Ziel der dritten Versuchsserie bestand in einem Erkenntnisgewinn darüber, ob IGF-1, das Ea-Peptid oder die Kombination beider Substanzen einen kardioprotektiven Effekt auf den Akutschaden nach einer globalen Myokardischämie hat.

Im Rahmen der spezifischen Versuchsprotokolle der drei experimentellen Serien unterliefen alle Herzen die zuvor beschriebenen Exzision-, Aufhänge- und Einschlagphasen. Im Anschluss erfolgte dann die Substanzapplikation bzw. die Myokardischämie nach den im Folgenden beschriebenen Versuchsprotokollen.

#### Versuchsserie 1 – Dosis-Wirkungs-Kurve

In der ersten Versuchsserie wurde IGF-1 in den Konzentrationen 0,05 nM, 0,5 nM, 5 nM, 15 nM, 50 nM, oder 500 nM über einen Zeitraum von 10 Minuten appliziert. Die Kontrollgruppe erhielt Vehikel (0,001% BSA in KH-Puffer).

Unser Ziel war es, eine IGF-1 Konzentration zu ermitteln, welche zu einer submaximalen Aktivierung der intrazellulären Signalwege führte, da zum einen eine unspezifische Aktivierung weiterer Rezeptoren (z.B. Insulin-Rezeptor) vermieden werden sollte, und zum anderen eine mögliche Steigerung der Signalwegsaktivierung durch das Ea-Peptid noch nachweisbar sein sollte. Daher sollte eine Konzentration möglichst nahe der ED50 bestimmt werden.

Als Marker der Signalwegsaktivierung wurde der Phosphorylierungsgrad von Akt (Ser473) im Western Blot verwendet. Unterstützend wurden zusätzlich der Phosphorylierungsgrad von AKT (Thr308), sowie der Akt-Isoformen AKT 1 (Ser473) und AKT 2 (Ser474) im Western Blot bestimmt.

Applikationsphase	
10 Minuten	
	Ana
Versuchsgruppen:	- Ph
Kontrolle	im
IGF 0,05 nM	
IGF 0,5 nM	
IGF 5 nM	
IGF 15 nM	1
IGF 50 nM	

IGF 500 nM

<u>Analyse:</u> - Phosphorylierung im Western Blot

**Abb. 6:** Zeigt eine Übersicht der unterschiedlichen IGF-1 Konzentrationen über 10 Minuten Applikation. Analysiert wurde die Proteinphosphorylierung im Western Blot.

## Versuchsserie 2 – 10 Minuten Applikation vier verschiedener Substanzklassen

Im Rahmen der zweiten Versuchsserie wurden entweder IGF-1 in einer Konzentration von 15 nM für 10 Minuten mit Ea-Peptid (75 nM; IGF + Ea) oder alleine (IGF) appliziert. Die Kontrollgruppe erhielt Vehikel (0,001% BSA in KH-Puffer; Kontrolle). Eine vierte Versuchsgruppe erhielt nur das Ea-Peptid (75 nM; Ea).

Das Ziel war es das Ausmaß der Proteinphosphorylierung von AKT, ERK 1/2 und GSK im Western Blot in Abhängigkeit von der applizierten Substanz zu untersuchen.

Applikationsphase	
10 Minuten	
	Analys
Versuchsgruppen:	- Phosp
IGF 15 nM	im Wes
Ea 75 nM	
IGF 15 nM + Ea 75 nM	
Kontrolle	
	1

Analyse: - Phosphorylierung im Western Blot

**Abb. 7:** Zeitliche Abfolge des Versuchsprotokolls für die Applikation unterschiedlicher der vier verschiedenen Versuchsgruppen IGF-1, IGF-1 plus Ea, Ea und Kontrolle über 10 Minuten.

Versuchsserie 3 – Ischämie-Reperfusions-Protokoll

In der dritten Versuchsserie unterliefen alle Herzen im Anschluss an die Einschlagphase eine 25 minütige globale Ischämie sowie 60 Minuten Reperfusion. Um ein Auskühlen der Herzen während der Ischämie zu verhindern, wurde das Unterteil der Wärmekammer mit 37 °C warmer PBS gefüllt und das Herz während der Ischämiephase darin eingetaucht.

Die Substanzapplikation erfolgte während der Reperfusion kontinuierlich. Die Kontrollgruppe erhielt Vehikel (0,001% BSA in KH-Puffer; Kontrolle) IGF-1 wurde in einer Konzentration von 15 nM mit Ea-Peptid (75 nM; IGF + Ea) oder alleine (IGF) appliziert. Eine vierte Versuchsgruppe erhielt nur das Ea-Peptid (75 nM; Ea).

Hierdurch sollte untersucht werden, ob IGF-1, das Ea-Peptid oder die Kombination beider Substanzen einen kardioprotektiven Effekt auf den Akutschaden nach einer globalen Myokardischämie hat.



**Abb. 8:** Zeitliche Abfolge des Versuchsprotokolls für die Applikation unterschiedlicher der vier verschiedenen Versuchsgruppen IGF-1, IGF-1 plus Ea, Ea und Kontrolle über 60 Minuten nach 25-minütiger Ischämie.

## 2.6.11 Einfrieren des Mausherzens

Zum Ende eines jeden Versuchsprotokolls wurden die Herzen abgehangen und Vorhöfe und verbliebene Gewebereste entfernt. Im Anschluss wurden die Ventrikel gewogen in zwei möglichst gleich große Hälften geteilt. Der Schnitt sollte so geführt werden, dass dabei beiden Hälften gleiche Anteile an linkem Ventrikel und rechtem Ventrikel enthielten. Die beiden Hälften wurden in 2 ml Mikroreaktionsgefäße gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

## 2.6.12 Auswertung der Hämodynamik

Während der Versuche wurden mit Hilfe der Software LabChart 7 kontinuierlich der Koronarfluss, der Perfusionsdruck sowie der linksventrikuläre Druck aufgezeichnet (Abb. 9). Des Weiteren wurde aus dem linksventrikulären Druck die Druckänderungsgeschwindigkeit (dP/dt) sowie die Herzfrequenz abgeleitet.



Abb. 9: Exemplarisches Beispiel einer Versuchsaufzeichnung in LabChart7. Zu sehen sind ein zeitlicher Ausschnitt der Aufzeichnung des Koronarflusses (CF), des Perfusionsdrucks (AOP), des linksventrikulären Drucks (LVP), der Druckänderungsgeschwindigkeit (dP/dt), sowie der Herzfrequenz (HR). Im angezeigten Ausschnitt sind eine Einschlagphase, eine 15 minütige Ischämie sowie circa 20 Minuten der Reperfusion zu sehen.

Für die Versuchsauswertung wurden zu festgelegten Zeitpunkten (Ende der Einschlagphase (baseline) sowie nach 5, 10, 15, 30, 45 und 60 Minuten der Reperfusion) folgende Werte ermittelt:

- aus der Kurve des linksventrikulären Drucks der Spitzendruck (LVSP), der enddiastolische Druck (LVEDP), sowie der entwickelte Druck (LVDP; Differenz zwischen LVSP und LVEDP),

 - aus der Kurve der Druckänderungsgeschwindigkeit das Maximum (dP/dt<sub>max</sub>) sowie das Minimum (dP/dt<sub>min</sub>),

- das rate pressure product (RPP; LVDP \* HR) als Maß der Herzarbeit

- die Herzfrequenz, sowie

- der Koronarfluss. Dieser wurde auf das bei Versuchsende gewogene Herzgewicht normiert (Fluss ml/min/g (Herzgewicht)).

### 2.7 LDH Aktivität im Effluat der Mäuseherzen im Langendorff Modell

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein ubiquitär in Zellen vorkommendes Enzym. Sie katalysiert die reversible Reaktion von NADH und Pyruvat zu NAD<sup>+</sup> und Laktat. Da es im Rahmen des Ischämie- und Reperfusionsschadens zu einer Freisetzung von LDH aus den geschädigten Zellen kommt, kann im Modell des isoliert, perfundierten Herzens die ins Effluat freigesetzte Menge an LDH als Maß des Myokardschadens bestimmte werden. Hierzu wurden Proben des Effluates vor der Ischämie sowie nach 5, 10, 15, 30 und 60 Minuten der Reperfusion genommen und bis zur späteren Analyse bei -80 °C gelagert.

#### 2.7.1 Bestimmung der LDH Aktivität mittels NADH Absorptionsänderung

In den gesammelten Effluatproben kann die LDH-Aktivität photometrisch bestimmt werden. Dieser Bestimmung liegt zu Grunde, dass es im Rahmen der durch die LDH katalysierten Reaktion zu einer Oxidation von NADH kommt, wodurch die NADH-Konzentration abfällt sowie die NAD<sup>+</sup>-Konzentration zunimmt. Dies kann durch eine veränderte Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 340 nm detektiert werden. Je höher die LDH-Konzentration ist, desto schneller wird NADH zu NAD umgesetzt und die Lichtabsorption bei 340 nm durch NADH ändert sich entsprechend schneller. Diese Veränderung der Absorption wird als Absorptionsänderung bezeichnet und korreliert mit der katalytischen Aktivität der LDH.

#### Pipettierschema und Versuchsdurchführung

50 µl der aufgefangenen Effluatproben wurde in eine 96-Well-Platte vorgelegt. Die LDH-Aktivität jeder Probe wurde durch 3-fach Bestimmung ermittelt. Auf einer 96-Well-Platte wurden Proben von Herzen verschiedener Versuchsgruppen, jedoch vom gleichen Zeitpunkt der Probenentnahme, analysiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Reaktionsmediums, welches NADH und Pyruvat enthielt, gestartet. Die Messung wurde bei 25 °C durchgeführt. Die Lichtabsorption bei 340 nm wurde alle 30 Sekunden über einen Zeitraum von 5 Minuten gemessen.

Je größer die Absorptionsänderung von NADH bei einer Wellenlänge von 340 nm war, desto größer war die LDH Aktivität im Reaktionsmedium. Eine höhere LDH Aktivität bedeutete eine höhere LDH Konzentration im Effluat und letztlich ein höheres Ausmaß der Zellschädigung nach Ischämie.

#### 2.7.2 Auswertung der Absorptionsänderung

Um die Absorptionsänderung zu berechnen, wurde zunächst das arithmetische Mittel der 3fachen Bestimmung einer jeden Probe gebildet. Das arithmetische Mittel der ersten Messung wurde mit A1 gekennzeichnet, alle weiteren arithmetischen Mittel der Absorption jeweils 30 Sekunden später mit A2, A3, A4, etc.

Die Absorptionsänderung (Delta Absorption) wurde nach folgender Formel berechnet: Delta Absorption = ((A1 - A2) + (A2 - A3) + (A3 - A4) + (A4 - A5) + (A5 - A6) + (A7 - A8) + (A8 - A9) + (A9 - A10) + (A10 - A11)) : 9

Die bestimmte Absorptionsänderung wurde auf das Herzgewicht normiert.

## 2.8 Analyse der Proteinphosphorylierung im Western Blot mittels Antikörperfärbung

#### 2.8.1 Aufbereitung und Lagerung der Herzen zur Proteingewinnung

Zur Proteinisolation wurde die halbierten Herzen in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 450 µl Kinase-Lysis-Puffer und 50 µl Protease und Phosphatase Inhibitormix (Thermo Fisher Scientific) überschichtet. Mit einem Gewebehomogenisator (Tissue Ruptor) wurde das Herz homogenisiert und für 2 Minuten mit Vmax bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit den isolierten Proteinen wurde in ein weiteres 2 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert.

#### 2.8.2 BCA-Assay

Zur Bestimmung des Proteingehalts der Proben wurde ein BCA-Assay mit dem Kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Ziel war es den Proteingehalt der einzelnen Proben anzugleichen und standardisierte Proben mit einer Proteinkonzentration von 2  $\mu g/\mu l$  herzustellen. Als Referenzreihe wurde eine Verdünnungsreihe von BSA nach Protokoll hergestellt. Eine 96-Loch-Platte wurde sowohl mit der Referenzreihe, als auch mit den Proben befüllt. Es wurden jeweils 25  $\mu l$  der Referenzreihe mit 2  $\mu l$  Kinase-Lysis-Puffer in die Reihe A der Well-Platte gegeben. Ab Reihe B wurden jede Probe dreifach vorgelegt und 2  $\mu l$  Probe auf 25  $\mu l$  ddH<sub>2</sub>O dazugegeben. Sowohl die Referenzreihe, als auch die dreifach bestimmten Proben wurden mit 200  $\mu l$  eines Farbindikators Pierce Protein Assay Reagent A und B (Verhältnis 50:1) überschichtet und für 30 Minuten im Klimaschrank bei 36 Grad Celsius belassen. Anschließend wurde die Absorption der Referenzreihe und der Proben in einem Photometer (SpectraCount) bei 577 nm gemessen. Mit den Absorptionswerten der Referenzreihe konnte eine Eichgerade generiert werden, bei der die ansteigende Absorption mit einer zunehmenden Proteinkonzentration korrelierte. Der Absorption der Proben konnte über die Eichgerade einer Proteinkonzentration zugeordnet werden. Mit Hilfe von Wasser wurden die Proben auf 2  $\mu$ g/ $\mu$ l Proteinkonzentration eingestellt und im Verhältnis 4:1 mit vierfach-konzentriertem Lämmli-Puffer mit Dithiothreitol (DDT) (Verhältnis 10:1) versetzt.

Die standardisierten Proben wurden für 5 Minuten bei 94 Grad Celsius in einem Thermomixer Eppendorf comfort erhitzt. Das Aufkochen bewirkt eine Denaturierung und Entfaltung der Proteine mit Hilfe des Laemmli-Puffers und des DDTs. Zum Schluss wurden die Proben in 50 µl Aliquots aufgeteilt, beschriftet und bei -20 Grad Celsius gelagert.

#### 2.8.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die standardisierten Proben wurden auf Eis aufgetaut.

Für die SDS-Polyacryl Gelelektrophorese wurde ein Sammelgel mit 2,5% SDS und ein Trenngel mit 10 % SDS zwischen 2 Glasscheiben gegossen.

In das Sammelgel wurde ein Kamm zur Bildung der Sammeltaschen eingeführt.

Nach dem Aushärten des Sammel- und Trenngels, wurden die Glasscheiben in einer Elektrophoresekammer eingehängt und SDS-Page-Laufpuffer hinzugegeben.

In die Sammeltaschen wurden 25 µg Protein der jeweiligen Probe gegeben.

Es wurde eine Spannung von 180 V mit 60-100 mA mittels Fisher Scientific Power 608 angelegt. Im Sammelgel wurden die Proben konzentriert und im Trenngel wurden die Proteine nach Größe und Ladung aufgetrennt. Als Größenstandard wurde 2 µl Prestained Proteins PageRuler (Thermo Scientific, #26616) verwendet. Die Auftrennung der Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese wurde beendet, sobald das Bromphenolblau aus dem Gel ausgelaufen war.

### 2.8.4 Western Blot

Zur Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine Membran würde ein Western Blot durchgeführt. Dafür wurde Cellulosepapier und eine Blotting Membran auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten. Jeweils zwei Schichten Cellulosepapier wurden in Anoden- und Kathodenpuffer getränkt. Auf die zwei Schichten Cellulosepapier mit Anodenpuffer wurde die Blotting Membran gelegt, darauf dann das SDS-Gel und letztlich zwei Schichten Cellulosepapier mit Kathodenpuffer. Das Konglomerat wurde nach Anleitung des Thermo Scientific Pierce G2 Fast Blotter in eine zugehörige Kassette mit Anode und Kathode eingelegt. Bei 25 V und 5.0 A wurden die Proteine aus dem Gel auf die Blotting Membran innerhalb von 7 Minuten übertragen. Letztlich wurde die Blotting Membran in einem Behältnis mit LiCore Blockig Puffer und TBS (1x) im Verhältnis 1:1 für 30 Minuten auf einen Schüttler inkubiert, um eine unspezifische Bindung der aufzutragenden Antikörper zu vermindern.

### 2.8.5 Auftragen des ersten und zweiten Antikörpers

Zur Detektion der Proteine wurde eine Antikörperfärbung durchgeführt. Die Blotting Membran wurde mit 5% BSA in TBS-T (Tris-buffered saline mit Tween20) samt primärem Antikörper luftblasenfrei in eine Plastikfolie eingeschweißt. Die Inkubation erfolgte über Nacht auf einem Rotator bei 4 Grad Celsius. Das Verhältnis zwischen Antikörper und TBS-T erfolgte nach der jeweiligen Herstellerempfehlung.

Die eingeschweißte Blotting Membran wurde aus der Folie gelöst, in ein Behältnis mit TBS-T gegeben und auf einem Schüttler für 10 Minuten inkubiert. Das Ziel war es nicht gebundene primäre Antikörper auszuwaschen. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt.

Als nächstes wurde die Blotting Membran erneut in eine Folie eingeschweißt. Vor dem endgültigen Einschweißen wurde in die Folie eine Lösung mit sekundärem Antikörper hinzugegeben. Die Lösung enthielt Blocking Puffer und TBS im Verhältnis 1:1, Tween 20 (1:1000), einen sekundären Antikörper gegen Mausantikörper mit der Signalfarbe Rot (1:10.000) und einen sekundären Antikörper gegen Kaninchenantikörper mit der Signalfarbe Grün (1:10.000). Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte für 45 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Rotator unter Alufolie als Lichtschutz.

Zum Schluss folgte ein Waschschritt für zwei Mal fünf Minuten TBS-T und einmal fünf Minuten mit TBS.

## 2.8.6 Messung der Signale

Für die Messung wurde die Blotting Membran im Odyssey Infrared Imager (Li-Cor) eingelesen. Die verwendete Software war Image Studio (Li-Cor). Die erfassten Signalwellenlängen lagen bei 800 nm (Rot auf den Bildern) für den sekundären Antikörper gegen Mausantikörper und bei 700 nm (Grün auf den Bildern) für den sekundären Antikörper gegen Kaninchenantikörper.

#### 2.8.7 Auswertung

Die Auswertung der Signale erfolgte im Image Studio Light (Li-Cor). Die Signale wurden in einem händisch angepassten Rechteck erfasst. Die Referenzsignale zur Erfassung des Hintergrundes wurden ober- und unterhalb des Rechtecks mit einer Breite von 2-3 Pixeln platziert.

Die Signalstärke der phosphorylierten Proteinmenge wurde in Verhältnis zu der Signalstärke der gesamten Proteinmenge gesetzt, daraus konnte der Phosphorylierungsgrad des jeweiligen Zielproteins bestimmt werden. Entsprechend der Zugehörigkeit zu einer Versuchsgruppe wurde das arithmetische Mittel des Phosphorylierunggrads gebildet und eine Standardabweichung berechnet. Für die statistische Berechnung wurde die Software Prism 6 (GraphPad) verwendet.

## 2.9 Verwendete Computerprogramme

- LabChart 7 (ADInstruments) wurde zur Verarbeitung der hämodynamischen Messungen aus dem Langendorff Modell verwendet. Es wurde Excel zur Erfassung der Daten der Hämodynamik verwendet.

- i-control (Tecan) wurde zur Erfassung der photometrischen Messungen der Absorptionsänderung von NADH zur Bestimmung der LDH Aktivität aus dem Plate Reader (Tecan) benötigt. Die Daten wurden dann mit der unter 2.7.2 beschriebenen Formel in Excel verarbeitet.

- SpectraWorks (Hewlett Packard) erfasste die photometrischen Messungen im SpectraCount zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen im Rahmen des BCA Assays.

- Image Studio (Li-Cor) und Image Studio light (Li-Cor) wurde für die Verarbeitung der photometrischen Messungen der Western Blot Signale genutzt.

- Prism 6 (GraphPad) wurde für die Erstellung der Graphen verwendet.

## 2.10 Statistik

Die statistischen Auswertungen der erhobenen Daten erfolgte mit Prism 6 (GraphPad). Als Signifikanzniveau wurde ein Alpha von 0,05 gewählt.

## Serie 1: IGF1 - Konzentrationsfindung

Zur Bestimmung der IGF-1 Konzentration, welche eine halbmaximale AKT-Phosphorylierung induziert, wurde die EC50 -Konzentration aus einer nicht-linearen Regressionskurve extrapoliert ("Nonlinear fit of EC50 shift"). Für jede IGF-1 Konzentration wurden 2 bis 3 Herzen verwendet.

## Serie 2: Proteinphosphorylierung nach 10 Minuten Applikation

One way Anova mit Tukey's multiple comparison test. Die Gruppengröße betrug n=5 für jede Gruppe.

## Serie 3: Hämodynamik im Ischämie- und Reperfusionsmodell

Two way Anova mit Tukey's multiple comparisons test. Die Gruppengröße der Kontrollgruppe betrug n=10, der IGF-1 Gruppe n=9, der IGF-1+Ea Gruppe n=8 und der Ea Gruppe n=8.

### Serie 3: LDH Aktivität im Ischämie- und Reperfusionsmodell

Two way Anova mit Tukey's multiple comparisons test. Die Gruppengröße der Kontrollgruppe betrug n=10, der IGF-1 Gruppe n=9, der IGF-1+Ea Gruppe n=8 und der Ea Gruppe n=8.

Serie 3: Proteinphosphorylierung im Ischämie- und Reperfusionsmodell

One way Anova mit Tukey's multiple comparisons test.

Die Gruppengröße betrug für die Kontrolle: Die Gruppengröße der Kontrollgruppe betrug n=10, der IGF-1 Gruppe n=9, der IGF-1+Ea Gruppe n=8 und der Ea Gruppe n=8.

## 3 Ergebnisse

#### 3.1 IGF-1 – Konzentrationsfindung

Ziel der Untersuchung war es, eine IGF-1 Konzentration zu ermitteln, welche zu einer submaximalen Aktivierung der IGF-1 abhängigen Signalwege führt. Die Rationale zur Wahl einer submaximalen Konzentration bestand darin, dass so eine mögliche Modulation des Phophorylierungsausmaßes durch das Ea-Peptid noch identifiziert werden könnte.

Die Applikation von IGF-1 führte konzentrationsanhängig zu einer Zunahme der AKT (Ser473) Phosphorylierung (siehe Abb. 10). Anhand der gezeigten Konzentrations-Wirkungs-Beziehung ergibt sich eine EC50 von ca. 8 nM IGF-1.



Abb. 10: Western Blot Analyse AKT (Ser473). A) Exemplarischer Western Blot der AKT-Phosphorylierung nach Stimulation mit verschiedenen IGF-1 Konzentrationen. Phospho-AKT(Ser473) in grün, pan AKT in rot. B) Dosis Wirkungs-Kurve IGF-1: Der Graph zeigt das Verhältnis zwischen dem Western Blot Signalen des an Serin-473 phosphorylierten AKT zur gesamten AKT Menge in Abhängigkeit von der applizierten IGF-1 Konzentration. Daten publiziert in Heinen et al (Mol Ther., 2019).<sup>50</sup>

Die Analysen des Phosphorylierungsausmaßes von AKT (Thr308), sowie von AKT1 (Ser473) und AKT2 (Ser474) zeigten ebenfalls eine Dosisabhängigkeit der IGF-1 Signalwegsaktivierung (Abb. 11). Hierbei wichen die IGF-1 Konzentrationen, welche einen halbmaximalen Phosphorylierungsgrad induzierten, nicht wesentlich von dem anhand der AKT(Ser473)-Analysen bestimmten Wert ab.



Abb. 11: Western Blot Analyse AKT (Thr308), AKT1 (Ser473) und AKT 2 (Ser474). A) Zeigt die Western Blots für Phospho-AKT (Thr308, links, grün), Phospho-AKT1 (Ser473, mittig, grün) und Phospho-AKT2 (Ser474, rechts, grün) zur jeweiligen Gesamtmenge AKT (rot) nach Stimulation mit verschiedenen IGF-1 Konzentrationen. B) Dosis Wirkungs-Kurve IGF-1: Der Graph zeigt das Verhältnis zwischen dem Western Blot Signalen des phosphorylierten AKT (Thr308, links), AKT1 (Ser473, mittig) und AKT2 (Ser474, rechts) jeweils zur gesamten AKT Menge in Abhängigkeit von der applizierten IGF-1 Konzentration.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse entschieden wir uns, eine IGF-1 Konzentration von 15 nM im Rahmen der weiteren Untersuchungen (Serie 2 und 3) dieser Dissertation zu verwenden, da sie in allen untersuchten AKT-Phosphorylierungsstellen zu einer deutlichen Zunahme des Phosphorylierungsgrades führte, welche allerdings submaximal war, so dass eine mögliche weitere Steigerung durch das Ea-Peptid noch nachweisbar wäre.

## 3.2 Akutgabe von IGF-1 bzw. Ea-Peptid und Proteinphosphorylierung

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob das Ea-Peptid entweder einen direkten Effekt auf den IGF-1 Signalweg hat, oder aber einen indirekten durch eine Modulation der IGF-1 induzierten Aktivierung.

Eine 10 minütige Gabe von IGF-1 führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer Zunahme der AKT (Ser473) Phosphorylierung (Abb. 12). Die alleinige Gabe des Ea-Peptids hatte keinen Einfluss die AKT (Ser473) Phosphorylierung. Zudem beeinflusste das Ea-Peptid die IGF-1 induzierte Steigerung des Phosphorylierungsgrades nicht.

Die Analysen der ERK1/2 Phosphorylierung als Marker des MAPK Signalwegs zeigten im Rahmen der statistischen Auswertung keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen (Abb. 13). Die Betrachtung sowohl der Western Blot Beispiele sowie der Gesamtauswertung deutet jedoch auf eine Tendenz zu einer IGF-1 bedingten ERK1/2 Phosphorylierung hin, wohingegen für das Ea-Peptid keine Hinweise auf direkte (im Vergleich zur Kontrollgruppe) oder indirekten Effekte (im Vergleich von IGF-1 + Ea zur IGF-1 Gruppe) zu erkennen sind.



Abb. 12: Western Blot Analyse AKT (Ser473). A) Zeigt den Western Blot für Phospho-AKT (Ser473) (grün) zur Gesamtmenge AKT (rot) in Abhängigkeit von der Versuchsgruppe Kontrolle, IGF-1, Ea-Peptid oder IGF-1 plus Ea-Peptid. B) Der Graph zeigt das Verhältnis der Signale für Phospho-AKT (Ser473) zur Gesamtmenge AKT im Western Blot abhängig von den Versuchsgruppen Kontrolle, IGF-1, Ea-Peptid oder IGF-1 plus Ea-Peptid. Signifikanzsymbole: ns = nicht signifikant; \*\*\*\* = signifikant (a  $\leq 0,0001$ ).



ERK1/2 (Thr202/Tyr204)

Abb. 13: Western Blot Analyse ERK1/2 (Thr202/Tyr204). A) Zeigt den Western Blot für Phospho-ERK 1/2 (grün) zur Gesamtmenge ERK1/2 (rot) in Abhängigkeit von der Versuchsgruppe Kontrolle, IGF-1, Ea-Peptid oder IGF-1 plus Ea-Peptid. B) Der Graph zeigt das Verhältnis der Signale für Phospho-ERK1 (Thr202) zur Gesamtmenge ERK1 im Western Blot abhängig von den Versuchsgruppen Kontrolle, IGF-1, Ea-Peptid oder IGF-1 plus Ea-Peptid. C) Der Graph zeigt das Verhältnis der Signale für Phospho-ERK2 (Tyr204) zur Gesamtmenge ERK2 im Western Blot abhängig von den Versuchsgruppen Kontrolle, IGF-1, Ea-Peptid oder IGF-1 plus Ea-Peptid. Signifikanzsymbole: ns = nicht signifikant.

Die zusätzlich durchgeführten Analysen des Phosphorylierungsgrades von AKT (Thr308), GSK (Ser9) sowie der AKT-Isoformen AKT1 (Ser473) und AKT2 (Ser474) zeigten vergleichbar zur AKT (Ser473) eine Steigerung durch Gabe von IGF-1 (Abb. 14). Das Ea-Peptid hatte weder einen eigenen Effekt auf die untersuchten Phosphorylierungsgrade, noch einen modulierenden Effekt auf die IGF-1 Wirkung.



Abb. 14: Western Blot Analyse AKT (Thr308), GSK (Ser9), AKT1 (Ser473) und AKT2 (Ser474). A) Zeigt die Western Blots für Phospho-AKT (Thr308, links oben, grün), Phospho-GSK (Ser9, rechts oben, rot), Phospho-AKT1 (Ser473, unten links, grün), Phospho-AKT2 (Ser474, unten rechts, grün) in Abhängigkeit von der Versuchsgruppe Kontrolle, IGF-1, Ea-Peptid oder IGF-1 plus Ea-Peptid. Als Vergleich werden jeweils die Signale für panAKT (links oben, rot), panGSK (rechts oben, grün), panAKT1 (links unten, rot) und panAKT2 (rechts unten, rot) gezeigt. B) Die Graphen zeigen das Verhältnis der Signale der phosphorylierten Proteine zu der jeweiligen Gesamtmenge der untersuchten Proteine im Western Blot abhängig von den Versuchsgruppen Kontrolle, IGF-1, Ea-Peptid oder IGF-1 plus Ea-Peptid. Signifikanzsymbole: ns = nicht signifikant; \*\*\*\* = signifikant (a  $\leq 0,0001$ ).

## 3.3 Herzfunktion im Ischämie- und Reperfusionsmodell

Untersucht wurde, ob Ea und/oder IGF-1 einen Effekt auf die Herzfunktion im Ischämie- und Reperfusionsmodell hat.

Zwischen den Versuchsgruppen bestand zu Versuchsbeginn (Baseline) kein Unterschied im RPP (Abb. 15), sowie Herzfrequenz, LVDP, LVSP, LVEDP, dP/dt<sub>max</sub> und dP/dt<sub>min</sub> (Abb. 16). Ebenfalls war der Koronarfluss zu diesem Zeitpunkt zwischen den Versuchsgruppen nicht unterschiedlich (Abbildung 17).



Rate pressure product

**Abb. 15**: Zeigt das **Rate pressure product (RPP)** als Produkt aus Herzfrequenz und entwickelten Druck. Auf der X-Achse zu sehen sind verschiedene Zeitpunkte vor der Ischämie (Baseline) und nach der Ischämie (Reperfusion). Auf der Y-Achse die entsprechende Herzarbeit. Signifikanzsymbole: \* = Kontrolle vs IGF-1+Ea; # = IGF-1 vs IGF-1+Ea. Daten publiziert in Heinen et al (Mol Ther., 2019).<sup>50</sup>

In der Kontrollgruppe führte die globale Ischämie zu einer deutlichen Abnahme des RPP, insbesondere zu den frühen Zeitpunkten der Reperfusion (Abb. 15). Ursächlich für diese Abnahme war nicht eine Veränderung der Herzfrequenz, sondern vielmehr eine Abnahme des entwickelten Drucks (Abb. 16). Diese Abnahme des LVDP war sowohl auf eine Zunahme des end-diastolischen Drucks, als auch auf eine Abnahme des systolischen Drucks zurückzuführen. Begleitend zu der reduzierten kardialen Druckarbeit zeigten sich auch reduzierte Druckänderungsgeschwindigkeiten.



Abb. 16: Daten der Hämodynamik. Die Abbildung zeigt auf der Y-Achse die Herzfrequenz (HF, links, oben), den entwickelten Druck (LVDP, rechts oben), den systolischen (LVSP, links mittig) und enddiastolischen (LVDP, rechts mittig), linksventrikulären Druck. Zudem werden die maximale (dP/dtmax, links unten) und minimale (dP/dtmin, rechts unten) Druckentwicklung pro Zeit. Auf der X-Achse werden verschiedene Zeitpunkte gezeigt. Angegeben ist die Baseline als Ausgangswert vor der Ischämie. Nach der Ischämie werden die Zeitpunkte der Reperfusion Minute 5, 10, 15, 30, 45 und 60 angeben. Signifikanzsymbole: LVDP: \* = Kontrolle vs IGF-1+Ea; LVSP: \* = Kontrolle vs IGF-1+Ea; LVEDP: \* = Kontrolle vs IGF-1+Ea,  $\alpha$  = IGF-1 vs Ea; dP/dt max: \* = Kontrolle vs IGF-1+Ea, # = IGF-1 vs IGF-1+Ea.

In der Kontrollgruppe führte die Ischämie zu keiner signifikanten Veränderung des Koronarflusses während der Reperfusion, wobei eine Tendenz zu einem gesteigerten Fluss nach 5 Minuten Reperfusion Vergleich zum Basalwert erkennbar war (Abb. 17).



Abb. 17: Zeigt den Koronarfluss pro Gramm Herzgewicht auf der Y-Achse zu verschiedenen Zeitpunkten auf der X-Achse. Signifikanzsymbole: \* = Kontrolle vs IGF-1+Ea,  $\beta$  = Kontrolle vs Ea.

In der Gesamtbetrachtung der erhobenen Parameter zeigt sich, dass weder die alleinige Gabe von IGF-1, noch die alleinige Gabe des Ea-Peptids einen Einfluss auf die Herzfunktion hat. Demgegenüber zeigte der Vergleich der IGF-1 + Ea Gruppe mit der Kontroll- bzw. IGF-1 Gruppe einzelne Veränderungen. So war beispielsweise nach 15 Minuten Reperfusion in der IGF-1 + Ea Gruppe ein erhöhter LVEDP im Vergleich zur IGF-1 Gruppe nachweisbar. Zudem zeigt die IGF-1 + Ea Gruppe zu diesem Zeitpunkt einen niedrigeren LVDP, sowie ein niedrigeres RPP im Vergleich zur IGF-1 Gruppe. Grundsätzlich lässt sich jedoch zusammenfassen, dass die Analysen der Parameter der Herzfunktion keinen Hinweis auf einen ausgeprägten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen ergaben. Dies lässt sich sowohl für IGF-1 alleine als auch in Kombination mit dem Ea-Peptid sagen. Zudem ergaben sich keine Hinweise auf eine eigene, direkte biologische Wirksamkeit des Ea-Peptids.

#### 3.4 LDH Aktivität im Effluat nach Ischämie

Zu Versuchsbeginn zeigte sich kein Unterschied in der LDH-Freisetzung zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 18). Die Ischämie führte zu einer ausgeprägten Zunahme der LDH-Freisetzung während der gesamten Reperfusion, wobei die höchsten LDH-Werte während der ersten 15 Minuten der Reperfusion nachweisbar waren.



**Abb. 18**: Zeigt die **LDH Aktivität pro Gramm Herzgewicht** auf der Y-Achse zu verschiedenen Zeitpunkten auf der X-Achse. Die Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander zum jeweiligen Zeitpunkt. Daten publiziert in Heinen et al (Mol Ther., 2019).<sup>50</sup>

Die alleinige Gabe von IGF-1 hatte keinen Einfluss auf die LDH-Freisetzung während der Reperfusion. Zudem zeigten sich keine Unterschiede in der LDH-Freisetzung, weder durch die kombinierte Gabe von IGF-1 mit dem Ea-Peptid, noch durch das Ea-Peptid alleine.

## 3.5 Proteinphosphorylierung nach Ischämie und Reperfusion

Vergleichbar der Stimulationsprotokolle über 10 Minuten wurde in dieser Versuchsserie eine eigene biologische Wirksamkeit des Ea-Peptids, sowie eine mögliche Modulation des AKT-Signalwegs durch das Ea-Peptid untersucht. Zentraler Parameter hierbei war der Phosphorylierungsgrad von AKT (Ser473). Unterstützend wurden zusätzlich die Phosphorylierungen von AKT (Thr308), der AKT-Isoformen AKT1 (Ser473) und AKT2 (Ser474), sowie der GSK (Ser9) nach 25 Minuten Ischämie und 60 Minuten Reperfusion betrachtet.

Die Gabe von IGF-1 nach der myokardialen Ischämie führte zu einer ausgeprägten Zunahme des Phosphorylierungsgrades von AKT(Ser473) (Abb. 19). Dieser Hinweis auf eine Stimulation des AKT-Signalweges wird unterstützt, dass auch die Phosphorylierungsgrade von AKT(Thr308), AKT1(Ser473), AKT2(474) sowie der GSK(Ser9) in der IGF-1 Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe gesteigert waren (Abb. 20).

#### AKT (Ser473)



Abb. 19: Western Blot Analyse AKT (Ser473). A) Zeigt das Signal für Phospho-AKT (Ser473) (grün) zur Gesamtmenge AKT (rot) im Western Blot in Abhängigkeit von der Versuchsgruppe Kontrolle, IGF-1, Ea-Peptid oder IGF-1 plus Ea-Peptid. B) Der Graph zeigt das Verhältnis der Signale für Phospho-AKT Serin zur Gesamtmenge AKT im Western Blot abhängig von den Versuchsgruppen Kontrolle, IGF-1, Ea-Peptid oder IGF-1 plus Ea-Peptid. Signifikanzsymbole: ns = nicht signifikant; \*\*\*\* = signifikant (a  $\leq$  0,0001).

Die Gabe des Ea-Peptids alleine führte zu keiner Veränderung aller hier bestimmter Phosphorylierungsgrade im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem hatte die Gabe des Ea-Peptids in Kombination mit IGF-1 keinen Effekt auf die IGF-1 induzierten Veränderungen.



Abb. 20: Western Blot Analyse AKT (Thr308), GSK (Ser9), AKT1 (Ser473) und AKT2 (Ser474). A) Zeigt die Signale im Western Blot für Phospho-AKT (Thr308, links oben, grün), Phospho-GSK Serin 9 (rechts oben, rot), Phospho-AKT1 (Ser473, unten links, grün), Phospho-AKT2 (Ser474, unten rechts, grün) in Abhängigkeit von der Versuchsgruppe Kontrolle, IGF-1, Ea-Peptid oder IGF-1 plus Ea-Peptid. Als Vergleich werden jeweils die Signale für panAKT (links oben, rot), panGSK (rechts oben, grün), panAKT1 (links unten, rot) und panAKT2 (rechts unten, rot) gezeigt. B) Die Graphen zeigen das Verhältnis der Signale der phosphorylierten Proteine zu der jeweiligen Gesamtmenge der untersuchten Proteine im Western Blot abhängig von den Versuchsgruppen Kontrolle, IGF-1, Ea-Peptid oder IGF-1 plus Ea-Peptid. Signifikanzsymbole: ns = nicht signifikant; \*\*\* = signifikant (a  $\leq 0,0001$ ).

## 4 Diskussion

#### 4.1 Schlussfolgerungen

Das Ziel dieser Arbeit war es zum einen, eine mögliche kardioprotektive Wirkung von IGF-1, dem Ea-Peptid oder einer Kombination beider auf den akuten Myokardschaden in Folge einer myokardialen Ischämie und Reperfusion zu untersuchen, und zum anderen die IGF-1 Signalkaskade hinsichtlich einer möglichen Beeinflussung durch das Ea-Peptid zu analysieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit ergaben keinen Hinweis auf eine kardioprotektive Wirkung von IGF-1, dem Ea-Peptid oder einer Kombination beider, weder auf die Herzfunktion, noch auf das Ausmaß des Myokardschadens nach dem akuten Herzinfarkt. Auch bezüglich der IGF-1 abhängigen Signalwege ergaben sich keine Hinweise auf eine modulierende Wirkung des Ea-Peptids. Des Weiteren scheint das Ea-Peptid keine eigene biologische Wirkung auf die Herzfunktion sowie die untersuchten Signalwege zu haben.

## 4.2 Eingesetzte IGF-1 Konzentration

Die neutralen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hinsichtlich einer kardioprotektiven Wirkung von IGF-1 werfen die Frage auf, ob eine zu niedrige IGF-1 Konzentration hierfür verantwortlich sein könnte. Bisher konnten für IGF-1 kardioprotektive Effekte im Rahmen einer myokardialen Ischämie und Reperfusion sowohl im in vivo Modell, als auch in vitro am isolierten Herz nachgewiesen werden. Aus den Arbeiten, in welchen der kardioprotektive Effekt von IGF-1 unter in vivo Bedingungen beschrieben wurde, lässt sich nur sehr bedingt eine wirksame IGF-1 Konzentration für das hier verwendete Modell mit isoliertem Herz ableiten. So verwendeten Santini et al eine transgene Mauslinie, bei welcher es zu einer chronischen IGF-1-Ea Überexpression in Kardiomyozyten kommt.<sup>48</sup> Die Mausherzen wurden mittels Ligatur der linken Koronararterie infarziert oder durch Kardiotoxin geschädigt, und die Tiere mit IGF-1-Ea Überexpression zeigten eine deutliche Verbesserung der Herzfunktion im Vergleich zu Kontrolltieren.48 Allerdings bleibt im diesen Modell ungeklärt, ob IGF-1 aus den Zellen freigesetzt wird, und welche lokalen oder systemischen Konzentrationen erreicht werden. In einer weiteren in vivo Arbeit applizierten Buerke et al. Ratten intraperitoneal 1 µg IGF-1 einmalig eine Stunde vor einer kardialen Ischämie.<sup>47</sup> Wie hoch die durch diese Einmalinjektion erzielten maximalen IGF-1 Plasmaspiegel sowie die Plasmaspiegel während der Reperfusion waren, wurde nicht untersucht.

Ein erster Literaturhinweis auf eine protektive IGF-1 Konzentration am isolierten Herzmodell ergibt sich aus einer Arbeit von Davani et al, welche in ihrer Untersuchung eine IGF-1 Konzentration von 10 ng/ml, was ungefähr 1,29 nM entspricht, verwendeten.<sup>46</sup> In Zellkulturversuchen von Brisson und Barton an Myoblasten und Fibroblasten wurden zur Stimulation von IGF-1 abhängigen Signalwegen IGF-1 Konzentrationen zwischen 2 und 10 nM verwendet,<sup>43</sup> also Konzentrationen, welche bis zu 7-8fach über der von Davani et al im isolierten Herzen verwendeten IGF-1 Konzentration lagen. Somit ergab sich auch aus den vorliegenden Arbeiten mit *in vitro* bzw. Zellkulturmodellen kein einheitliches Bild, welche IGF-1 Konzentration für unser Versuchsmodell am isoliert, perfundierten Mausherzen zu einer robusten Aktivierung von IGF-1 abhängigen Signalwegen führt, ohne dabei Effekte zu vermitteln, welche unabhängig vom IGF-1 Rezeptor sind.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit eine Dosis-Wirkungskurve erstellt. Hierbei bestand das Ziel darin, eine IGF-1 Konzentration zu ermitteln, welche zu einer submaximalen Aktivierung der Signalwege führt, da so eine mögliche Modulation des Phosphorylierungsgrades durch das Ea-Peptid noch identifiziert werden könnte. Die anhand der Dosis-Wirkungskurve ermittelte IGF-1 Konzentration betrug 15 nM.

Neben der IGF-1 Konzentration musste zusätzlich noch eine Konzentration des Ea-Peptids festgelegt werden. Da allerdings unbekannt war, ob das Ea-Peptid überhaupt einen Effekt auf intrazelluläre Signalwege besitzt, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Dosis-Wirkungskurve für das Ea-Peptid erstellt werden. Somit orientierten wir uns an den *in vitro* Untersuchungen von Brisson und Barton. Diese verwendeten für ihre Untersuchungen an Myoblasten und Fibroblasten Ea-Peptidkonzentrationen bis zu 100 nM, d.h. Konzentrationen, welche bis zum 10fach über den IGF-1 Konzentrationen lagen.<sup>43</sup> Vor diesem Hintergrund entschieden wir uns, eine Konzentration von 75 nM Ea-Peptid zu verwenden, welche einerseits in unserer Versuchsreihe etwa der 10-fachen Konzentration der EC50 unserer Dosis-Wirkungskurve von 8 nM IGF-1 für AKT (Ser473), bzw. dem 5-fachen der verwendeten IGF-1 Konzentration von 15 nM entsprach.

## 4.3 IGF-1, Ea-Peptid und intrazelluläres Signaling

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Gabe von IGF-1 zu einer deutlichen Zunahme der AKT Phosphorylierung führt, wohingegen sich keine Hinweise auf eine biologische Aktivität des Ea-Peptids ergaben. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Brisson und Barton, welche in C2C12 Myoblasten zeigen konnten, dass das Ea-Peptid über eine Aktivierung des IGF-1 Rezeptors zu einer Aktivierung des MAPK-Signalwegs führte. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der MAPK-Signalwegsaktivierung durch das Ea-Peptid könnte der unterschiedliche zeitliche Verlauf der durchgeführten Experimente sein. So war bei Brisson und Barton eine gesteigerte ERK1/2 Phosphorylierung erst 15 Minuten nach der Gabe des Ea-Peptids nachweisbar,<sup>43</sup> wohingegen in der vorliegenden Arbeit der ERK1/2-Phosphorylierungsgrad bereits 10 Minuten nach IGF-1 Gabe analysiert wurde. Die Versuchsprotokolle der vorliegenden Arbeit wurden auf einen Nachweis einer AKT Phosphorylierung optimiert. Wenn also im Anschluss an eine IGF-1 Rezeptoraktivierung eine Aktivierung des MAPK Signalwegs später als eine Aktivierung des PI3K/AKT Signalwegs erfolgen sollte, kann aus den Untersuchungen dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden, dass das Ea-Peptid zu späteren Zeitpunkten einen Effekt auf die ERK1/2 Phosphorylierung hat.

Eine weitere Diskrepanz der Ergebnisse dieser Dissertation zu den Ergebnissen von Brisson und Barton besteht darin, dass im hier verwendeten Modell keine Modulation der durch IGF-1 aktivierten Signalwege nachgewiesen werden konnte. Inwiefern auch hier ein möglicher modulatorischer Effekt des Ea-Peptids auf die IGF-1 abhängigen Signalwege, insbesondere auf eine verstärkte Aktivierung des MAPK Signalwegs, erst zeitlich verzögert auftreten könnte, kann anhand der vorliegenden Daten dieser Arbeit nicht beurteilt werden. Neben der möglichen Zeitkomponente als Ursache der gefundenen Diskrepanzen hinsichtlich der Ea-Peptid-Wirkung auf die Signalkaskaden könnten auch Unterschiede im verwendeten Ea-Peptid einen Einflussfaktor darstellen. Die Aminosäuresequenz des in dieser Dissertation verwendeten Ea-Peptids entspricht der des von Brisson und Barton verwendeten Ea-Peptids.

## 4.4 IGF-1, Ea-Peptid und Ischämie/Reperfusion: Kardiale Funktion

In unserem Modell konnten wir keinen protektiven Effekt von IGF-1 auf die kardiale Funktion nach einer myokardialen Ischämie nachweisen. Das Ea-Peptid hatte ebenfalls keinen protektiven Effekt, weder alleine, noch in Kombination mit IGF-1. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Davani et al., welche am isolierten Herzmodell einen protektiven Effekt für IGF-1 zeigen konnten.

Betrachtet man die Entwicklung der Hämodynamik nach der Ischämie bei Davani et al., sieht man bereits nach 20 Minuten Reperfusion einen kardioprotektiven Effekt, welcher über den gesamten Beobachtungszeitraum von 120 Minuten erhalten bleibt.<sup>46</sup> Davani et al verwendeten ein isoliertes Herzmodell mit Druckableitung über eine Kanüle in der Aorta, <sup>46</sup> welches am ehesten einem working heart Model entspricht.<sup>51</sup> Im Gegensatz zu Davani verwendeten wir zur Druckableitung einem Ballonkatheter im linken Ventrikel. Dieser Unterschied im gewählten Modell könnte von Bedeutung sein, da Stensløkken et al. eine Beeinflussung der Proteinphosphorylierung durch die Wahl des Modells mit isoliertem Herz nachweisen

konnten.<sup>52</sup> Hierbei wiesen Herzen im working heart Modell einen geringeren Phosphorylierungsgrad von ERK1/2, p38-MAPK und JNK auf als Herzen nach Langendorff mit linksventrikulärem Ballonkatheter.<sup>52</sup> Sowohl das working heart Modell, als auch das isolierte Herzmodell nach Langendorff erhöhten die Proteinphosphorylierung von ERK 1/2, p38-MAPK und JNK im Vergleich zu nicht perfundierten Herzen.52 Stensløkken et al schlussfolgerten aus den Ergebnissen ihrer Studie, dass eine Einschlagzeit von mindestens 40 sei, einer Minuten notwendig um Modell-induzierten Proteinphosphorylierung entgegenzuwirken.<sup>52</sup> Sie stützten sich dabei auf Daten der Arbeitsgruppe um Bell et al., welche eine Dynamik der Proteinphosphorylierung von p38-MAPK im isolierten Rattenherzen nach Langendorff mit Ballonkatheter nachweisen konnten.<sup>53</sup> 10 Minuten nach Beginn der Perfusion kam es zu einem deutlichen Anstieg der Phosphorylierung von p38-MAPK, um nach 40 Minuten auf Anfangsniveau zurückzufallen.53 Interessanterweise zeigte sich bezüglich der AKT, dass das Phosphorylierungsausmaß AKT im working heart Modell nach 20 Minuten erniedrigt im Vergleich zu nicht-perfundierten Mäuseherzen war.<sup>52</sup> Im Gegensatz hierzu gab es zum gleichen Zeitpunkt keine Unterschiede in der AKT-Phosphorylierung zwischen isoliert, perfundierten Herzen mit linksventrikulärem Ballonkatheter, also bei Herzen mit isovolumetrischer Arbeit, und nicht-perfundierten Herzen.<sup>52</sup> Zusammenfassend zeigen diese Studien, dass der Proteinphosphorylierungsgrad verschiedener Signalschritte durch methodische Unterschiede beeinflusst werden kann. Hierzu zählen insbesondere das gewählte Perfusionsmodell sowie die Dauer der Stabilisierungsphase nach Beginn der in vitro Perfusion. Solche methodischen Unterschiede zwischen den diskutierten Arbeiten könnten zu den zum Teil diskrepanten Ergebnissen beigetragen haben.

In unserer Versuchsreihe konnten wir während der Reperfusion keine Unterschiede in den linksventrikulären Funktionsparametern zwischen der Kontrollgruppe und der IGF-1 Gruppe sowie der Ea-Peptid Gruppe feststellen. Die kombinierte Gabe von IGF-1 und Ea-Peptid führte nach 15 Minuten Reperfusion zu einem erhöhten LVEDP sowie zu einer niedrigeren Druckentwicklung und Herzarbeit im Vergleich zur IGF-1 Gruppe. Da allerdings vergleichbare Unterschiede weder zu früheren Zeitpunkten der Reperfusion, noch zu späteren Zeitpunkten nachweisbar waren, scheinen die gefundenen Unterschiede eher auf zufälligen Streuungen der Messungen zu basieren, als auf Wirkungen der IGF-1/Ea-Peptidkombination zu beruhen.

Zusammenfassend ergeben sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit keine Hinweise darauf, dass IGF-1 bzw. das Ea-Peptid einen Effekt auf die linksventrikuläre Funktion in der Akutphase nach einem Myokardinfarkt hat.

#### 4.5 IGF-1, Ea-Peptid und Ischämie/Reperfusion: Akuter Myokardschaden

Nach einem akuten Myokardinfarkt wird die kardiale Pumpfunktion stark durch das Ausmaß des Myokardschadens beeinflusst. Wir konnten in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss von IGF-1, Ea oder der Kombination beider auf die Aktivität von Laktatdehydrogenase im Perfusat als Marker für das Ausmaß des Zellschadens nach einer myokardialen Ischämie zeigen. Vor diesem Hintergrund, dass die Behandlungen mit IGF-1 und/oder dem Ea-Peptid keinen Effekt auf den akuten Myokardschaden haben, erscheinen auch die Ergebnisse der zuvor beschriebenen kardialen Funktionsanalysen plausibel, welche ebenfalls keinen relevanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen zeigten. Interessanterweise konnten wir in einem *in vivo* Modell mir regionaler Myokardischämie und Reperfusion nachweisen, dass IGF-1 auch hier keinen Effekt auf das Ausmaß des akuten Myokardschadens hatte.<sup>50</sup> Da allerdings in dieser Untersuchung ein deutlicher Erhalt der kardialen Pumpfunktion in der mit IGF-1 behandelten Versuchsgruppe zu späteren Zeitpunkten, nämlich 7 sowie 28 Tage nach dem Ischämieereignis, nachweisbar war, scheint der kardioprotektive Effekt von IGF-1 eher auf einer positiven Beeinflussung des kardialen Remodelings, als auf einer Reduktion des akuten Ischämie- und Reperfusionsschadens zu beruhen.<sup>50</sup>

Das Ergebnis dieser Arbeit, dass IGF-1 den akuten Myokardschaden nicht beeinflusst, steht allerdings im Widerspruch zu anderen Arbeiten, welche einen solchen Effekt nachweisen konnten. So zeigten Buerke et al. in einem *in vivo* Modell an Ratten eine verringerte Kreatinkinase-Aktivität als Hinweis auf einen reduzierten Myokardschaden nach einer IGF-1 Behandlung.<sup>47</sup> Beim Vergleich der Versuchsprotokolle zwischen der vorliegenden Dissertation und der Arbeit von Buerke et al. zeigen sich allerdings Unterschiede, welche die gefunden Diskrepanzen bezüglich des kardioprotektiven Potentials von IGF-1 erklären könnten. Zum einen erfolgte die Analyse des Infarktschadens bei Buerke et al. 24 Stunden nach dem Infarktereignis, wohingegen bei uns die LDH-Freisetzung in den ersten 60 Minuten der Reperfusion analysiert wurde. Ein weiterer Unterschied zwischen den Studien besteht im Applikationszeitpunkt des IGF-1. In der Arbeit von Buerke et al. wird das IGF-1 erst während der Reperfusion gegeben wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir im Rahmen dieser Dissertation kein Hinweis auf einen kardioprotektiven Effekt von IGF-1, dem Ea-Peptid oder einer kombinierten Gabe beider Substanzen auf den akuten Zellschaden des Herzens nachgewiesen konnten.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt. Sterbefälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen insgesamt 2020. 25.01.2022.

2. Statistisches Bundesamt. Gestorbene: Deutschland, Jahre, Todesursachen, Geschlecht. 25.01.2022.

3. Freisinger E, Sehner S, Malyar NM, Suling A, Reinecke H and Wegscheider K. Nationwide Routine-Data Analysis of Sex Differences in Outcome of Acute Myocardial Infarction. *Clin Cardiol.* 2018;41:1013-1021.

4. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L and Investigators IS. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004;364:937-52.

5. Keil U, Liese AD, Hense HW, Filipiak B, Doring A, Stieber J and Lowel H. Classical risk factors and their impact on incident non-fatal and fatal myocardial infarction and all-cause mortality in southern Germany. Results from the MONICA Augsburg cohort study 1984-1992. Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Diseases. *Eur Heart J*. 1998;19:1197-207.

6. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, White HD and Executive Group on behalf of the Joint European Society of Cardiology /American College of Cardiology /American Heart Association /World Heart Federation Task Force for the Universal Definition of Myocardial I. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation*. 2018;138:e618-e651.

7. Neumann FJ, Sousa-Uva M, Ahlsson A, Alfonso F, Banning AP, Benedetto U, Byrne RA, Collet JP, Falk V, Head SJ, Juni P, Kastrati A, Koller A, Kristensen SD, Niebauer J, Richter DJ, Seferovic PM, Sibbing D, Stefanini GG, Windecker S, Yadav R, Zembala MO and Group ESCSD. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Heart J*. 2019;40:87-165.

8. Valgimigli M, Bueno H, Byrne RA, Collet JP, Costa F, Jeppsson A, Juni P, Kastrati A, Kolh P, Mauri L, Montalescot G, Neumann FJ, Petricevic M, Roffi M, Steg PG, Windecker S, Zamorano JL, Levine GN, Group ESCSD, Guidelines ESCCfP and Societies ESCNC. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS: The Task Force for dual antiplatelet therapy in coronary artery disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J.* 2018;39:213-260.

9. Roffi M, Patrono C, Collet JP, Mueller C, Valgimigli M, Andreotti F, Bax JJ, Borger MA, Brotons C, Chew DP, Gencer B, Hasenfuss G, Kjeldsen K, Lancellotti P, Landmesser U, Mehilli J, Mukherjee D, Storey RF, Windecker S and Group ESCSD. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2016;37:267-315.

10. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, Caforio ALP, Crea F, Goudevenos JA, Halvorsen S, Hindricks G, Kastrati A, Lenzen MJ, Prescott E, Roffi M, Valgimigli M, Varenhorst C, Vranckx P, Widimsky P and Group ESCSD. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2018;39:119-177.

 Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Daten zu Herzinfarkten in der Region Augsburg (Mortalität, Morbidität, Letalität, Vorerkrankungen, medizinische Versorgung).
 2021, 15. Februar.

12. Bhar-Amato J, Davies W and Agarwal S. Ventricular Arrhythmia after Acute Myocardial Infarction: 'The Perfect Storm'. *Arrhythm Electrophysiol Rev.* 2017;6:134-139.

13. Stone SG, Serrao GW, Mehran R, Tomey MI, Witzenbichler B, Guagliumi G, Peruga JZ, Brodie BR, Dudek D, Mockel M, Brener SJ, Dangas G and Stone GW. Incidence, predictors, and implications of reinfarction after primary percutaneous coronary intervention in ST-segment-elevation myocardial infarction: the Harmonizing Outcomes with Revascularization and Stents in Acute Myocardial Infarction Trial. *Circ Cardiovasc Interv.* 2014;7:543-51.

14. Reeder GS. Identification and treatment of complications of myocardial infarction. *Mayo Clin Proc.* 1995;70:880-4.

15. Burke AP and Virmani R. Pathophysiology of acute myocardial infarction. *Med Clin North Am.* 2007;91:553-72; ix.

16. Heusch G and Gersh BJ. The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: a continual challenge. *Eur Heart J.* 2017;38:774-784.

17. Kroemer G and Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med.* 2000;6:513-9.

18. Borutaite V, Budriunaite A, Morkuniene R and Brown GC. Release of mitochondrial cytochrome c and activation of cytosolic caspases induced by myocardial ischaemia. *Biochimica et biophysica acta*. 2001;1537:101-9.

19. Porter AG and Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999;6:99-104.

20. Nian M, Lee P, Khaper N and Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circulation research*. 2004;94:1543-53.

21. Pfeffer MA and Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990;81:1161-72.

22. Rosen T and Bengtsson BA. Premature mortality due to cardiovascular disease in hypopituitarism. *Lancet*. 1990;336:285-8.

23. Juul A, Scheike T, Davidsen M, Gyllenborg J and Jorgensen T. Low serum insulinlike growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease: a populationbased case-control study. *Circulation*. 2002;106:939-44. 24. Yamaguchi H, Komamura K, Choraku M, Hirono A, Takamori N, Tamura K, Akaike M and Azuma H. Impact of serum insulin-like growth factor-1 on early prognosis in acute myocardial infarction. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*. 2008;47:819-25.

25. Bourron O, Le Bouc Y, Berard L, Kotti S, Brunel N, Ritz B, Leclercq F, Tabone X, Drouet E, Mulak G, Danchin N and Simon T. Impact of age-adjusted insulin-like growth factor 1 on major cardiovascular events after acute myocardial infarction: results from the fast-MI registry. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100:1879-86.

26. Jones JI and Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.* 1995;16:3-34.

27. Brisson BK and Barton ER. New Modulators for IGF-I Activity within IGF-I Processing Products. *Frontiers in endocrinology*. 2013;4:42.

28. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ and Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*. 1993;75:59-72.

29. Reeves I, Abribat T, Laramee P, Jasmin G and Brazeau P. Age-related serum levels of insulin-like growth factor-I, -II and IGF-binding protein-3 following myocardial infarction. *Growth Horm IGF Res.* 2000;10:78-84.

30. Dean HJ, Kellett JG, Bala RM, Guyda HJ, Bhaumick B, Posner BI and Friesen HG. The effect of growth hormone treatment on somatomedin levels in growth hormone-deficient children. *J Clin Endocrinol Metab.* 1982;55:1167-73.

31. Cohick WS and Clemmons DR. The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol*. 1993;55:131-53.

32. Clemmons DR and Van Wyk JJ. Factors controlling blood concentration of somatomedin C. *Clin Endocrinol Metab.* 1984;13:113-43.

33. Hwa V, Oh Y and Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev.* 1999;20:761-87.

34. Troncoso R, Ibarra C, Vicencio JM, Jaimovich E and Lavandero S. New insights into IGF-1 signaling in the heart. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2014;25:128-37.

35. Ito H, Hiroe M, Hirata Y, Tsujino M, Adachi S, Shichiri M, Koike A, Nogami A and Marumo F. Insulin-like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes. *Circulation*. 1993;87:1715-21.

36. Delaughter MC, Taffet GE, Fiorotto ML, Entman ML and Schwartz RJ. Local insulinlike growth factor I expression induces physiologic, then pathologic, cardiac hypertrophy in transgenic mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1999;13:1923-9.

37. Kardami E. Stimulation and inhibition of cardiac myocyte proliferation in vitro. *Mol Cell Biochem*. 1990;92:129-35.

38. Siddle K. Molecular basis of signaling specificity of insulin and IGF receptors: neglected corners and recent advances. *Frontiers in endocrinology*. 2012;3:34.

39. Kavran JM, McCabe JM, Byrne PO, Connacher MK, Wang Z, Ramek A, Sarabipour S, Shan Y, Shaw DE, Hristova K, Cole PA and Leahy DJ. How IGF-1 activates its receptor. *Elife*. 2014;3.

40. Hakuno F and Takahashi SI. IGF1 receptor signaling pathways. *J Mol Endocrinol*. 2018;61:T69-T86.

41. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P and Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J*. 1996;15:6541-51.

42. Manning BD and Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007;129:1261-74.

43. Brisson BK and Barton ER. Insulin-like growth factor-I E-peptide activity is dependent on the IGF-I receptor. *PloS one*. 2012;7:e45588.

44. Reiss K, Kajstura J, Zhang X, Li P, Szoke E, Olivetti G and Anversa P. Acute myocardial infarction leads to upregulation of the IGF-1 autocrine system, DNA replication, and nuclear mitotic division in the remaining viable cardiac myocytes. *Exp Cell Res*. 1994;213:463-72.

45. Yamamura T, Otani H, Nakao Y, Hattori R, Osako M and Imamura H. IGF-I differentially regulates Bcl-xL and Bax and confers myocardial protection in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H1191-200.

46. Davani EY, Brumme Z, Singhera GK, Cote HC, Harrigan PR and Dorscheid DR. Insulin-like growth factor-1 protects ischemic murine myocardium from ischemia/reperfusion associated injury. *Critical care (London, England)*. 2003;7:R176-83.

47. Buerke M, Murohara T, Skurk C, Nuss C, Tomaselli K and Lefer AM. Cardioprotective effect of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92:8031-5.

48. Santini MP, Tsao L, Monassier L, Theodoropoulos C, Carter J, Lara-Pezzi E, Slonimsky E, Salimova E, Delafontaine P, Song YH, Bergmann M, Freund C, Suzuki K and Rosenthal N. Enhancing repair of the mammalian heart. *Circulation research*. 2007;100:1732-40.

49. Ruseska I and Zimmer A. Internalization mechanisms of cell-penetrating peptides. *Beilstein J Nanotechnol.* 2020;11:101-123.

50. Heinen A, Nederlof R, Panjwani P, Spychala A, Tschaidse T, Reffelt H, Boy J, Raupach A, Godecke S, Petzsch P, Kohrer K, Grandoch M, Petz A, Fischer JW, Alter C, Vasilevska J, Lang P and Godecke A. IGF1 Treatment Improves Cardiac Remodeling after Infarction by Targeting Myeloid Cells. *Mol Ther*. 2019;27:46-58.

51. Larsen TS, Belke DD, Sas R, Giles WR, Severson DL, Lopaschuk GD and Tyberg JV. The isolated working mouse heart: methodological considerations. *Pflugers Arch*. 1999;437:979-85.

52. Stenslokken KO, Rutkovskiy A, Kaljusto ML, Hafstad AD, Larsen TS and Vaage J. Inadvertent phosphorylation of survival kinases in isolated perfused hearts: a word of caution. *Basic Res Cardiol.* 2009;104:412-23.

53. Bell JR, Eaton P and Shattock MJ. Role of p38-mitogen-activated protein kinase in ischaemic preconditioning in rat heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008;35:126-34.

## Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. Axel Gödecke für die Möglichkeit bedanken, dass ich als Doktorand am Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf im Rahmen des SFB 1116 meine Doktorarbeit absolvieren konnte. Es war eine sehr lehrreiche und spannende Zeit mit Rückschlägen und Erfolgsmomenten. Ebenfalls möchte ich mich für die unermüdliche Unterstützung meiner Betreuer André Heinen, Annika Raupach und Rianne Nederlof bedanken. Weiter möchte ich einen großen Dank an Julia Albrecht und Susanne Küsters aussprechen, die jederzeit mit Rat für die auszuführenden Versuche zur Seite standen.

Zuletzt möchte ich mich noch besonders bei meiner Frau Henrike Reffelt für die große Unterstützung bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.