

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Acht-Kanal-Recorder MK 200A
 Blutgasanalysegerät ABL 510
 Gamma-Zähler Wizard 2480
 Gel- und Blottingkammersystem
 Criterion™ XT
 Gewebezerkleinerer Ultra-Turrax
 Heizblock MHR 13
 Hypercassette™ RPN 13642
 Messkammer für mitochondriale
 Respiration Mitocell S200
 Micromanometer P5
 Mikrotestplatten-Leser ELISA
 Model 680
 Narkosegerät Sulla 808
 pH-Elektrode Blue Line 15 pH
 pH-Meter Accumet Basic
 Pipetten
 Reinstwasseranlage Milli-Q
 Advantage A 10
 Rollerpumpe Masterflex L

 Ultraschall-Desintegrator D-450
 Ultrazentrifuge M120SE
 Vortex MS1 Minishaker
 Waagen 770
 P1000N
 Zentrifuge 5702R

Gould, Cleveland, OH, USA
 Radiometer, Copenhagen, DK
 PerkinElmer, Waltham, MA, USA
 Bio-Rad, Hercules, CA, USA

 IKA, Staufen, DE
 HLC, Pforzheim, DE
 Amersham LifeScience
 Strathkelvin, Glasgow, UK

 Königsberg, Pasadena, CA, USA
 Bio-Rad, Hercules, CA, USA

 Dräger, Lübeck, DE
 Schott Instruments, Mainz, DE
 Fisher Scientific, Schwerte, DE
 Eppendorf, Hamburg, DE
 Millipore, Schwalbach, DE

 Cole-Parmer Instruments, Vernon
 Hills, IL, USA
 Branson, Danbury, CT, USA
 Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
 IKA, Staufen, DE
 Kern, Balingen, DE
 Mettler, Gießen, DE
 Eppendorf, Hamburg, DE

2.1.2 Chemikalien

2-Mercapto-ethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Adenosindiphosphat (ADP)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Albumin Standard	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Alkohole (Ethanol (EtOH), Methanol (MeOH))	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Calcium green-5N	Invitrogen, Darmstadt, DE
Calciumchlorid (CaCl_2)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Carbonylcyanid-p-trifluor-methoxyphenyl-hydrazon (FCCP)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cyclosporin A	Sandoz, Holzkirchen, DE
DC Protein Assay	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Dextran 40	Roth, Karlsruhe, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Entwickler Neutrol WA	Agfa, Mortsel, BE
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Enfluran	ABCR, Karlsruhe, DE
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glutaminsäure (Glutamat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Härtelösung für Fixierbäder	AdefoChemie, Dietzenbach, DE
Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure (HEPES)	Serva, Oftringen, CH
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ketamin-Hydrochlorid	Sanofi-Ceva, Düsseldorf, DE
Kochsalzlösung	B. Braun, Melsungen, DE
L-Ascorbinsäure (Ascorbat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Malinsäure (Malat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Milchpulver (Blotting Grade Blocker)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Natriumazid (NaN_3)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Oftringen, CH
Natrium-Heparin	Ratiopharm, Ulm, DE
NuPAGE Transferpuffer (20x)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Osmiumtetroxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Percoll	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Ponceau S-Lösung	Serva, Oftringen, CH
Probenpuffer XT (4x)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Complete Protease Inhibitor	Roche, Basel, CH
Proteinstandard Precision Plus	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Reduktionsmittel XT (20x)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Rotenon	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Silberchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Substrat LumiGLO® Reagent (20x)	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Substrat SuperSignal West Femto	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Succinylsäure (Succinat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Sucrose	MP Biomedicals, Solon, OH, USA
Tetramethylphenylendiamin (TMPD)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Thiopental	Inresa, Freiburg, DE
Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris-Base (Tris)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween 20	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Zellyse-Puffer (10x)	Cell Signaling, Danvers, MA, USA

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Cryoröhrchen	VWR international, West Chester, PA, USA
Filter-Papier für das Western-Blotting	Schleicher & Schuell, Dassel, DE
Gele Criterion™ XT (10% Bis-Tris)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Hyperfilm ECL	Amersham, Brüssel, BE
Mikrosphären (¹⁰³ Ru, ⁹⁵ Nb, ⁴⁶ Sc)	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Mikrotiterplatten	Kisker, Steinfurt, DE
Nahtmaterial	Mectron, Köln, DE
Nitocellulose Membranen (0,2 µm)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, DE
	Roth, Karlsruhe, DE
	Biozym, Balingen, DE
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, DE
Schläuche	Masterflex, Gelsenkirchen, DE
Spritzen	B. Braun, Melsungen, DE

Teflonmembranen	Strathkelvin, Glasgow, UK
Zentrifugegefäße (14 ml, 50 ml)	Kisker, Steinfurt, DE

2.1.4 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen für Akutversuche am narkotisierten Schwein

TTC-Färbelösung:

Natriumphosphat-Puffer:

5,2	mM	ortho-Phosphorsäure
130	mM	NaOH Plätzchen
0,6	µM	Dextran T 40
mit NaOH pH = 7,4 eingestellt		

Färbelösung:

12,8	mM	TTC in Natriumphosphat-Puffer
------	----	-------------------------------

JAK/STAT-Inhibitor:

25	mg	AG490 in 500 µl DMSO
----	----	----------------------

CsA-Infusion:

5	mg/kg	in 20 ml physiologischer Kochsalzlösung
---	-------	---

Puffer für die Herstellung von Proteinlysaten aus Biopsien und Mitochondrien des Schweinemyokards

Homogenisierungspuffer (H-Puffer):

1 x	Protease-Inhibitorlösung
1 x	Zellyse-Puffer

Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western-Blot-Analysen

MOPS-Laufpuffer:

100	mM	MOPS
100	mM	Tris Base
7	mM	SDS
20,5	mM	EDTA

Transferpuffer:

1 x	NuPAGE Transfer Buffer
20 %	Methanol

Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS)-Puffer:

10	mM	Tris
150	mM	NaCl

mit konz. HCl pH = 7,6 eingestellt

Gebrauchslösung (TBS-T):

0,1 %	Tween-20 in TBS
-------	-----------------

Blockierlösung:

5 %	Milchpulver in TBS-T
-----	----------------------

Stripping-Puffer:

62,5	mM	Tris pH 6,8
2	%	SDS
100	mM	Mercaptoethanol

mit konz. HCl pH = 6,8 eingestellt

Puffer und Lösungen für die Mitochondrienisolation

Mitochondrienpuffer:

250	mM	Sucrose
10	mM	HEPES
1	mM	EGTA

mit Tris pH = 7,4 eingestellt

BSA-Puffer:

0,5	%	BSA in Mitochondrienpuffer
-----	---	----------------------------

Percoll-Lösung:

30	%	Percoll in Mitochondrienpuffer
----	---	--------------------------------

Puffer und Lösungen für die Messung der Mitochondrienfunktion

Elektrolytlösung:

300	mM	Na ₂ HPO ₄
200	mM	KH ₂ PO ₄
140	mM	KCl
		AgCl gesättigt
0,1	%	Na

Inkubationspuffer Glutamat/Malat:

125	mM	KCl
5/5	mM	Glutamat/Malat
10	mM	MOPS
5	mM	KH ₂ PO ₄
5	mM	MgCl ₂
20	μM	EGTA

mit Tris pH = 7,4 eingestellt

Inkubationspuffer Succinat:

125	mM	KCl
5	mM	Succinat
10	mM	MOPS
5	mM	KH ₂ PO ₄
5	mM	MgCl ₂
20	μM	EGTA

mit Tris pH = 7,4 eingestellt

Stocklösungen für Mitochondrienfunktionsmessung und entsprechende Lösungsmittel:

500	μM	Rotenon in EtOH	
100	mM	ADP	in A. dest.
150	mM	TMPD	in DMSO
500	mM	Ascorbat	in A. dest.
5	μM	FCCP	in EtOH

2.1.5 Antikörper

Tab. 2.1: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper bei der Western-Blot-Analyse

Antikörper	Wirt	Phosphorylierungs- stelle	Vertreiber	Verdünnung
Anti-Phospho-STAT3	Kaninchen	Tyrosin 705	Cell Signaling	1:250
Anti-Phospho-STAT3	Kaninchen	Serin 727	Cell Signaling	1:250
Anti-STAT3	Kaninchen	-----	Cell Signaling	1:250
Anti-Phospho-AKT	Kaninchen	Serin 473	Cell Signaling	1:500
Anti-AKT	Kaninchen	-----	Cell Signaling	1:500
Anti-Phospho-ERK1/2	Maus	Tyrosin 204	Santa Cruz	1:500
Anti-ERK1/2	Maus	-----	R&D Systems	1:500
Anti-Phospho-GSK3 β	Kaninchen	Serin 9	Cell Signaling	1:500
Anti-GSK3 β	Maus	-----	BD Transduction	1:1000
Anti-Phospho-eNOS	Kaninchen	Serin 1177	Cell Signaling	1:250
Anti-eNOS	Kaninchen	-----	Cell Signaling	1:250
Anti-(Na ⁺ /K ⁺)-ATPase	Maus	-----	Upstate	1:1000
Anti-(SERCA2)-ATPase	Maus	-----	Sigma	1:1000
Anti-HDAC2	Kaninchen	-----	Abcam	1:10000
Anti-GAPDH	Maus	-----	Hyttest	1:2500
Anti-MnSOD	Kaninchen	-----	Millipore	1:1000

Tab. 2.2: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper bei der Western-Blot-Analyse

Antikörper/Serum	Wirt	Abkürzung	Hersteller	Verdünnung
Peroxidase-konjugierter anti-Maus IgG	Pferd	HRP-anti-ms	Cell Signaling	1:4000
Peroxidase-konjugierter anti-Kaninchen IgG	Ziege	HRP-anti-rb	Cell Signaling	1:4000

2.2 Methoden

2.2.1 Akutversuche am narkotisierten Schwein

Die Genehmigung für das Versuchsprotokoll erfolgte durch das Bioethik-Komitee des Regierungsbezirks Düsseldorf (Aktenzeichen 8.87-50.10.34.09.040). Die Durchführung der Tierversuche entsprach den Leitlinien der *National Institutes of Health* (85-23) in der revidierten Version von 1996.

2.2.1.1 Experimentelle Präparation

Männliche Göttinger Minischweine mit einem Gewicht von 20-40 kg wurden nach Sedierung durch Ketamin-Hydrochlorid (1 g intramuskulär) mit Thiopental (500 mg intravenös) narkotisiert. Nach der Tracheotomie und der Intubation erfolgte die Beatmung über ein Narkosegerät. Die Narkose wurde mit Enfluran (1-1,5 %) in einem Sauerstoff/Stickstoff-Gemisch (40:60 %) aufrechterhalten. Beide Karotiden wurden mit Polyethylen-Kathetern kanüliert: über einen Katheter wurde der arterielle Blutdruck gemessen, über den anderen Katheter erfolgte die Blutversorgung eines extrakorporalen Perfusionssystems. Eine Jugularis-Vene wurde kanüliert, um eine Volumensubstitution mittels vorgewärmter 0,9 %iger Kochsalzlösung zu ermöglichen. Durch eine links-laterale Thorakotomie im vierten Interkostalraum wurde das Herz freigelegt. Der linksventrikuläre Druck wurde über ein Mikromanometer im linken Ventrikel, das durch den Apex implantiert wurde, gemessen. Etwa 1,5 cm des *Ramus interventricularis anterior* (RIVA) der linken Koronararterie wurden frei präpariert. Nach Antikoagulation mit 20.000 IU Natrium-Heparin wurde der RIVA ligiert, kanüliert und mittels eines extrakorporalen Perfusionssystems, bestehend aus einer Rollerpumpe, einem Windkessel und einem Zugang für die Injektion von Mikrosphären, perfundiert. Der koronare Perfusionsdruck wurde mit einem elektronischen Druckaufnehmer an der Spitze der Perfusionskanüle gemessen. Um eine Hypoperfusion zu vermeiden, wurde der minimale Perfusionsdruck durch Justierung der Geschwindigkeit der Rollerpumpe vor Beginn des Versuchsprotokolls über 75 mmHg gehalten. Nach Messung der

systemischen Hämodynamik sowie der regionalen myokardialen Durchblutung unter Kontrollbedingungen wurde das Perfusionsareal des RIVA einer Ischämie unterzogen, indem der koronare Einstrom auf ca. 10 % des koronaren Einstroms unter Kontrollbedingungen reduziert wurde. Nach 5 min Ischämie wurden die myokardiale Durchblutung und die Hämodynamik ein weiteres Mal gemessen. Nach 90 min Ischämie wurde das Myokard je nach Protokoll für bis zu 120 min reperfundiert. Für die Messung der regionalen myokardialen Durchblutung im Perfusionsareal wurden radioaktiv markierte Mikrosphären (Durchmesser: 15 μm ; ^{103}Ru , ^{95}Nb oder ^{46}Sc) in den extrakorporalen Perfusionskreislauf injiziert. Während des gesamten Versuchsprotokolls wurden zur Kontrolle die arteriellen Blutgaswerte gemessen und durch Anpassung der Atmung und intravenöse Natriumbicarbonat-Infusion konstant gehalten. Die systemische Hämodynamik (Herzfrequenz, maximaler Druck im linken Ventrikel, Maximum der ersten Ableitung des linksventrikulären Drucks, mittlerer koronarer Perfusionsdruck, mittlerer koronarer Einstrom) wurde mittels CORDAT II Software gemessen (Skyschally *et al.*, 1993).

2.2.2 Versuchsprotokolle

Für die Ermittlung der Infarktgröße und die Untersuchung der Mitochondrienfunktion wurde das Versuchsprotokoll zu verschiedenen Zeitpunkten der Reperfusion beendet: für die Bestimmung der Infarktgröße und die Messung der Proteinphosphorylierung im Zeitverlauf wurden die Versuche nach 120 min Reperfusion terminiert. Für die Untersuchung der Proteinphosphorylierung in Mitochondrien und der Mitochondrienfunktion erfolgte die Beendigung des Versuchs nach 10 min Reperfusion.

2.2.2.1 Ischämische Postkonditionierung

Nach 90 min Ischämie erfolgte das PoCo-Manöver mit jeweils 6 x 20 s Re-Okklusions- und Reperfusionszyklen. Anschließend wurde das Myokard dauerhaft reperfundiert.

2.2.2.2 Schnelle Reperfusion

Für eine schnelle vollständige Reperfusion (SR) wurde der Perfusionsdruck während der Reperfusion so eingestellt, dass er dem Perfusionsdruck unter Kontrollbedingungen entsprach.

2.2.2.3 Ischämische Postkonditionierung und schnelle Reperfusion mit JAK/STAT-Blockade

Um den JAK/STAT-Signalweg zu blockieren, wurden Reperfusionsprotokolle wie unter Punkt 2.2.2.1 bzw. 2.2.2.2 beschrieben durchgeführt, bei denen eine intrakoronare Infusion von AG490 (9 µg/min/kg, mit 1 mg/kg Totaldosis) erfolgte. Die Infusion wurde 10 min vor Beginn der Ischämie begonnen und bis zum Ende der Reperfusion fortgeführt.

2.2.2.4 Cyclosporin A-Infusion

Bei 85 min Ischämie erfolgte eine intravenöse Infusion von CsA (5 mg/kg in 20 ml physiologischer Kochsalzlösung). Nach 90 min Ischämie erfolgte eine SR wie in 2.2.2.2 beschrieben. Die Daten der SR dienten als Kontrolle.

2.2.3 Entnahme der Myokardbiopsien

Unter Kontrollbedingungen und zu den Zeitpunkten 85 min Ischämie, 5, 10, 30 und 120 min Reperfusion wurden transmurale Biopsien mit einem Gewicht von 10-20 mg aus dem Risikoareal entnommen, kurz in physiologischer Kochsalzlösung gespült, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und für spätere Analysen bei -80 °C gelagert.

2.2.4 Infarktgröße

Für die Bestimmung der Infarktgröße wurde das Herz am Ende des Experiments entnommen, in 5 transversale Scheiben geschnitten und mit TTC-Färbelösung gefärbt. Durch die TTC-Färbung war das infarzierte Myokard von vitalem Gewebe abgegrenzt. Der Anteil von infarziertem Myokard wurde als prozentualer Anteil des Risikoareals bestimmt. Die Größe des Risikoareals wurde dabei mittels Mikrosphären-Technik bestimmt (Heusch *et al.*, 2008b) und als prozentualer Anteil des linken Ventrikels angegeben.

2.2.5 Entnahme der Myokardproben für die Mitochondrienisolation

Für die Isolierung von Mitochondrien wurde nach 10 min Reperfusion das ischämisch/reperfundierte Gebiet mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung reperfundiert, um das Risikoareal zu markieren. Anschließend wurden größere Myokardproben (ca. 6-10 g) aus dem Risikoareal sowie aus der Hinterwand des linken Ventrikels, die als Kontrolle diente, entnommen.

Kardioprotektion durch Aktivierung des mitochondrialen
Signal Transducer and Activator of Transcription 3 nach
ischämischer Postkonditionierung im Schwein

Gedik, N.

2015, XIV, 44 S. 12 Abb., Softcover

ISBN: 978-3-658-10660-7