

**PRÄVENTION DES ISCHÄMIE-
REPERFUSIONSSCHADENS IN DER LEBER:
MOLEKULARE WIRKMECHANISMEN
PHARMAKOLOGISCHER UND ISCHÄMISCHER
PRÄKONDITIONIERUNG**



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Anke Christina Förnges

aus Düren/NRW

2003

Erklärung:

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Absatz 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Frau Prof. Dr. Angelika M. Vollmar betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 10.04.03

.....
(Anke Förnges)

Dissertation eingereicht am 10.04.03

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. A. M. Vollmar

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. E. Wagner

Mündliche Prüfung: 17.06.03

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
1 EINLEITUNG	1
1.1 Hintergrund und Fragestellungen	1
1.2 Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber	4
1.2.1 Klinische Bedeutung	4
1.2.2 Pathomechanismen.....	5
1.2.2.1 Ischämische Phase	5
1.2.2.2 Reperfusions-Phase.....	6
1.2.3 Rolle der Matrix Metalloproteinasen (MMPs) beim Ischämie-Reperfusionsschaden	7
1.2.3.1 Überblick	7
1.2.3.2 Struktur	8
1.2.3.3 Regulation der Aktivität	10
1.2.3.4 Rolle beim Ischämie-Reperfusionsschaden in der Leber.....	12
1.2.4 Prävention des Ischämie-Reperfusionsschadens	12
1.2.4.1 Überblick	12
1.2.4.2 Hormonelle Präkonditionierung mit dem Atrialen Natriuretischen Peptid.....	13
1.2.4.3 Präkonditionierung mit α -Liponsäure.....	14
1.2.4.4 Ischämische Präkonditionierung.....	16
1.3 Das Atriale Natriuretische Peptid.....	19
1.3.1 Natriuretische Peptide	20
1.3.2 Die Natriuretischen Peptidrezeptoren und ihre Signaltransduktion.....	21
1.3.2.1 Aufbau der Rezeptoren	21
1.3.2.2 cGMP-abhängige Signaltransduktion in der Leber.....	23
1.4 Hämoxygenase-1.....	24
1.4.1 Biologische Funktion	24
1.4.2 Bedeutung beim Ischämie-Reperfusionsschaden.....	25
1.5 Ferritin und Eisenregulierende Proteine	26
1.5.1 Ferritin.....	26
1.5.1.1 Aufbau und biologische Funktion.....	26
1.5.1.2 Regulation der Ferritinexpression.....	27
1.5.2 Eisenregulierende Proteine.....	29
1.5.2.1 Überblick	29

1.5.2.2	Regulation der RNA-Bindungsaktivität.....	30
1.6	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	31
1.6.1	Biologische Funktion	31
1.6.2	Neue Funktionen von GAPDH in Säugetierzellen.....	31
1.7	Quantifizierung von mRNA mittels Real-Time PCR.....	33
2	MATERIAL UND METHODEN	37
2.1	Die isoliert perfundierte Rattenleber.....	37
2.1.1	Tiere	37
2.1.2	Lösungen	37
2.1.3	Durchführung	37
2.1.3.1	Kalte Ischämie und Reperfusion.....	38
2.1.3.2	Warme Ischämie und Reperfusion.....	39
2.1.3.3	Vorbehandlung der Organe.....	39
2.1.3.4	Depletion der Kupferzellen	40
2.2	Das Tiermodell für die Ischämische Präkonditionierung	41
2.2.1	Tiere	41
2.2.2	Durchführung	42
2.3	Zellkultur	43
2.3.1	Tiere	43
2.3.2	Lösungen	43
2.3.3	Kultivierung	45
2.3.4	Isolierung primärer Hepatozyten.....	45
2.4	Bakterien.....	47
2.4.1	Eingesetzter Stamm.....	47
2.4.2	Nährmedien und Antibiotika.....	47
2.4.3	Kultivierung	48
2.5	Vektoren.....	48
2.5.1	Verwendete Plasmide.....	48
2.6	RNA Electrophoretic Mobility Shift Assay.....	49
2.6.1	Probenvorbereitung	49
2.6.1.1	Lösungen	49
2.6.1.2	Herstellung zytoplasmatischer Extrakte aus Rattenlebern.....	49
2.6.1.3	Herstellung zytoplasmatischer Extrakte aus Rattenhepatozyten.....	50

2.6.2	Messung der Proteinkonzentration	50
2.6.2.1	Lösungen	50
2.6.2.2	Durchführung.....	51
2.6.3	Amplifizierung einer DNA-Sonde	51
2.6.3.1	Herstellung kompetenter Bakterienzellen.....	52
2.6.3.2	Transformation	52
2.6.3.3	Schnellisolierung der amplifizierten Plasmid-DNA	53
2.6.3.4	Agarose-Gelelektrophorese	54
2.6.3.5	Plasmidisolierung mit Qiagen® Plasmid Midi Kit	55
2.6.4	<i>In Vitro</i> Transkription mit radioaktiv-markierten Nukleotiden.....	57
2.6.4.1	Restriktionsverdau	57
2.6.4.2	Aufreinigung der Plasmid-DNA	58
2.6.4.3	Synthese einer radioaktiv-markierten cRNA	59
2.6.4.4	DNase-Verdau	59
2.6.4.5	Aufreinigung der cRNA	59
2.6.5	Bindungsreaktion und gelelektrophoretische Auftrennung.....	60
2.6.5.1	Lösungen	60
2.6.5.2	Bindungsreaktion.....	61
2.6.5.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	61
2.6.5.4	Detektion	62
2.7	Isolierung von Ribonukleinsäuren.....	63
2.7.1	Extraktion von Ribonukleinsäuren.....	63
2.7.1.1	Guanidiniumthiocyanat/Cäsiumchlorid-Methode.....	64
2.7.1.2	Extraktion mit RNeasy® Mini Kit (Qiagen).....	64
2.7.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen.....	65
2.7.3	Gelelektrophoretische Auftrennung von Ribonukleinsäuren.....	65
2.7.3.1	Lösungen	66
2.7.3.2	Agarose-Gelelektrophorese	66
2.8	Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	67
2.8.1	Reverse Transkription	67
2.8.2	Amplifizierung spezifischer cDNA templates	68
2.8.2.1	Primer und Reaktionsbedingungen	68
2.8.2.2	Polymerase-Kettenreaktion.....	69
2.8.3	Agarose-Gelelektrophorese	69
2.9	Real-Time PCR.....	70
2.9.1	PCR mit SYBR® Green.....	70
2.9.1.1	DNase-Verdau	70

2.9.1.2	Reverse Transkription.....	71
2.9.1.3	Real-Time PCR.....	71
2.9.2	PCR mit TaqMan® Sonde	73
2.9.2.1	Reverse Transkription.....	73
2.9.2.2	Real-Time PCR.....	74
2.10	Anreicherung von Proteinen mittels Immunpräzipitation.....	75
2.10.1	Probenvorbereitung	75
2.10.1.1	Lösungen	75
2.10.1.2	Herstellung von Proteinextrakten aus Rattenlebern.....	75
2.10.2	Immunpräzipitation	75
2.11	Detektion von Proteinen mittels Western Blot	76
2.11.1	Probenvorbereitung	77
2.11.1.1	Lösungen	77
2.11.1.2	Herstellung von Proteinextrakten aus Rattenlebern.....	78
2.11.1.3	Herstellung von Proteinextrakten aus Rattenhepatozyten.....	78
2.11.1.4	Vorbereitung der Proben für die Elektrophorese	78
2.11.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	79
2.11.2.1	Lösungen	79
2.11.2.2	Durchführung.....	80
2.11.3	Immunologische Detektion von Proteinen durch Western Blot.....	81
2.11.3.1	Lösungen	81
2.11.3.2	Proteintransfer durch Semidry-Blotting.....	82
2.11.3.3	Verwendete Antikörper	83
2.11.3.4	Inkubation mit Antikörpern und Detektion.....	84
2.11.3.5	Ablösung von gebundenen Antikörpern und erneute Detektion.....	84
2.11.4	Coomassie Blau-Färbung	85
2.11.4.1	Lösungen	85
2.11.4.2	Durchführung.....	85
2.12	Nachweis von Matrix Metalloproteinasen mittels Zymographie.....	86
2.12.1	Lösungen	86
2.12.2	Durchführung	87
2.13	Statistik.....	88
3	ERGEBNISSE	89
3.1	Einfluss von ANP auf die Aktivität von Matrix Metalloproteinasen	89
3.1.1	Nachweis der Anwesenheit von MMPs	89

3.1.2	Einfluss von ANP auf MMPs.....	90
3.2	Regulation von Eisenregulierenden Proteinen und Ferritin	92
3.2.1	Hormonelle Präkonditionierung mit ANP.....	92
3.2.1.1	IRP-Bindungsaktivität und Ferritinexpression im Verlauf von kalter Ischämie und Reperfusion.....	92
3.2.1.2	Einfluss von ANP und 8-Br-cGMP auf die IRP-Bindungsaktivität und Ferritinexpression....	94
3.2.1.3	Versuche an isolierten Rattenhepatozyten.....	98
3.2.1.4	Versuche an Kupferzell-depletierten Rattenlebern.....	99
3.2.1.5	Perfusion mit HO-1 Inhibitor.....	99
3.2.1.6	Phosphorylierung von IRP-1	101
3.2.2	Präkonditionierung mit alpha-Liponsäure.....	103
3.2.2.1	IRP-Bindungsaktivität im Verlauf von warmer Ischämie und Reperfusion	103
3.2.2.2	Einfluss von α -Liponsäure auf die IRP-Bindungsaktivität	104
3.2.2.3	Ferritinexpression im Verlauf von warmer Ischämie und Reperfusion	106
3.2.2.4	Einfluss von α -Liponsäure auf die Expression von Ferritin	107
3.2.3	Ischämische Präkonditionierung	109
3.2.3.1	Einfluss auf die IRP-Bindungsaktivität und Ferritinexpression.....	109
3.3	Einfluss von ANP auf die Expression von GAPDH	112
3.3.1	GAPDH mRNA-Expression	112
3.3.1.1	Ergebnisse der RT-PCR.....	112
3.3.1.2	Ergebnisse der Real-Time PCR.....	113
3.3.2	GAPDH Proteinexpression	115
4	DISKUSSION	117
4.1	Regulation von Eisenregulierenden Proteinen und Ferritin	117
4.1.1	Hormonelle Präkonditionierung mit ANP.....	119
4.1.1.1	IRP-Bindungsaktivität und Ferritinexpression im Verlauf von Ischämie und Reperfusion....	119
4.1.1.2	Einfluss von ANP auf die IRP-1 Bindungsaktivität und die Ferritinexpression	120
4.1.1.3	Zelluläre Lokalisation der ANP-Effekte.....	121
4.1.1.4	Zusammenhang zur HO-1 Induktion	123
4.1.1.5	Einfluss von ANP auf den Phosphorylierungsstatus von IRP-1	123
4.1.2	Präkonditionierung mit alpha-Liponsäure.....	124
4.1.2.1	IRP-Bindungsaktivität im Verlauf von warmer Ischämie und Reperfusion	124
4.1.2.2	Reduktion der IRP-Bindungsaktivität durch α -Liponsäure	125
4.1.3	Ischämische Präkonditionierung	126

4.2	Einfluss von ANP auf die Aktivität von Matrix Metalloproteinasen	117
4.2.1	Anwesenheit von MMPs	117
4.2.2	Einfluss von ANP auf MMPs.....	118
4.3	Einfluss von ANP auf die Expression von GAPDH	128
4.3.1	GAPDH mRNA-Expression mittels RT-PCR.....	128
4.3.2	GAPDH mRNA-Expression mittels Real-Time PCR.....	129
4.3.3	GAPDH Proteinexpression	131
5	ZUSAMMENFASSUNG	133
6	ANHANG.....	135
6.1	Abkürzungen	135
6.2	Alphabetische Liste der Firmen.....	140
6.3	Veröffentlichungen.....	142
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	143
8	DANKSAGUNG.....	169
9	LEBENS LAUF.....	171

1 EINLEITUNG

1.1 HINTERGRUND UND FRAGESTELLUNGEN

Ischämie-Reperfusionsschäden (IRS) führen zu erheblichen klinischen Problemen nach Lebertransplantationen, Leberresektionen und nach hämorrhagischem Schock. Während der Ischämiephase, die entweder durch kurzzeitige, temporäre Abtrennung der Blutzufuhr bei Leberresektionen (warme Ischämie) oder durch längere Unterbrechung des Blutflusses und Lagerung des Organs bei 4°C (kalte Ischämie) bei Lebertransplantationen ausgelöst wird, werden auf molekularer Ebene diverse Pathomechanismen in Gang gesetzt, die zu ersten Zellschädigungen führen. Sobald in der Phase der Reperfusion die Blutzufuhr wiederhergestellt ist und das Organ mit sauerstoffreichem Blut versorgt wird, wird dieser Schaden erheblich verstärkt. IRS tragen in 5-15% der Fälle zu primärem Organversagen und zur Organdysfunktion bei. Der Suche nach neuen Therapieansätzen zur Verminderung von IRS und der Aufklärung der beteiligten Wirkmechanismen kommt daher eine besondere Bedeutung zu.

Im Rahmen dieser Arbeit sind die molekularen Wirkmechanismen von drei verschiedenen Ansätzen zur Prävention des IRS in der Rattenleber untersucht worden: Die Präkonditionierung mit dem Atrialen Natriuretischen Peptid (ANP), einem kardiovaskulären Hormon, die Präkonditionierung mit α -Liponsäure, einer Substanz, die zur Therapie der diabetischen Polyneuropathie eingesetzt wird, und die Ischämische Präkonditionierung, bei der das Organ einem oder mehreren kurzen Ischämieintervallen (2-10 min) mit anschließender Reperfusion ausgesetzt wird. Im Zentrum stand dabei die Frage, ob durch die jeweilige Prävention das Eisenspeicherprotein Ferritin induziert werden kann. Diesem Protein wird ein zytoprotektives Potential nachgesagt, da es Eisen abfängt, das über die Fenton Reaktion an der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt ist und so zum oxidativen Stress der Zelle erheblich beiträgt. Untersucht wurden in diesem Zusammenhang auch die an der Regulation von Ferritin beteiligten Iron Regulatory Proteins (IRPs). Dies sind RNA-bindende Proteine, die die Ferritinexpression posttranskriptionell regulieren. Bei erniedrigten Eisenspiegeln in der Zelle binden sie an ein regulatorisches Element (Iron Responsive Element, IRE) in der Ferritin mRNA und verhindern dessen Translation. Bei erhöhten Eisenspiegeln ist die IRP-Bindungsaktivität herabgesetzt und Ferritin wird translatiert.

Hormonelle Präkonditionierung mit ANP schützt vor Ischämie-Reperfusionsschäden in der isoliert perfundierten Rattenleber (Bilzer *et al.*, 1994; Gerbes *et al.*, 1998). Außerdem wurde gezeigt, dass ANP die mRNA-Expression der Hämoxxygenase-1 (HO-1), eines induzierbaren Enzyms, das den oxidativen Abbau von Häm katalysiert, bereits nach 30 min Perfusion signifikant erhöht (Gerwig *et al.*, 2001, abstract). Eine HO-1 Induktion wird als protektiver Mechanismus beim Schutz vor IRS diskutiert (Amersi *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 2000; Terajima *et al.*, 2000). Beschrieben ist auch, dass HO-1 in Fibroblasten durch den Abbau von Häm die intrazellulären Eisenspiegel erhöhen und somit die Expression von Ferritin induzieren kann (Vile *et al.*, 1993 und 1994). Aufgrund dieser Befunde sollte untersucht werden, ob Präkonditionierung mit ANP über eine Induktion der HO-1 die RNA-Bindungsaktivität der IRPs vermindern und auf diese Weise die Ferritinexpression erhöhen kann.

Die RNA-Bindungsaktivität der IRPs wird jedoch nicht nur über die Eisenspiegel der Zelle reguliert. Proteinkinase C (PKC) steigert in HL60-Zellen die IRP-Bindungsaktivität durch Phosphorylierung an Ser138 (Schalinske und Eisenstein, 1996). ANP seinerseits kann in isoliert perfundierten Lebern die membrangebundenen Formen der α - und ε -PKC signifikant erniedrigen (Kenngott *et al.*, 2001, abstract). Ob auch in unserem Modell ANP die Aktivität der IRPs über die PKC modulieren kann, war ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit.

Präkonditionierung mit α -Liponsäure, einer natürlich vorkommenden antioxidativen Substanz, die zur Therapie der diabetischen Polyneuropathie eingesetzt wird, ist ein weiterer Ansatz, den IRS zu reduzieren. An der Protektion durch α -Liponsäure ist in der isoliert perfundierten Rattenleber die Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt-Signalwegs wesentlich beteiligt (Müller *et al.*, in Revision). α -Liponsäure besitzt zudem auch eisenchelatierende Eigenschaften (Biewenga *et al.*, 1997; Packer 1998). Da die Gabe von Eisenchelatoren beim IRS protektiv wirkt (Omar *et al.*, 1989; Colet *et al.*, 1996; Amersi *et al.*, 2001), sollte anhand der Bindungsaktivität der IRPs und der Ferritinexpression untersucht werden, ob α -Liponsäure die Eisenhomöostase beeinflussen kann.

Bei der **Ischämischen Präkonditionierung** der Leber wird das Organ einem oder mehreren kurzen Ischämieintervallen (2-10 min) mit anschließender Reperfusion ausgesetzt, die es gegenüber IRS unempfindlicher machen (Peralta *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 1998; Arai *et al.*, 1999). Berenshtein *et al.* postulieren im Herzen eine Beteiligung von Ferritin und Eisen an der Schutzwirkung (Berenshtein *et al.*, 2002). Daher wurde der Einfluss der Ischämischen Präkonditionierung auf IRPs und Ferritin in der Rattenleber näher untersucht.

Neben dem Einfluss auf die Eisenhomöostase sollte in den mit ANP präkonditionierten Lebern noch ein weiterer Pathomechanismus des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens näher betrachtet werden: Die Aktivierung von **Matrix Metalloproteinasen (MMPs)**. Diese Enzymfamilie ist vor allem nach kalter Ischämie für eine Ablösung der sinusoidalen Endothelzellen von der sie umgebenden Matrix verantwortlich (Upadhyia *et al.*, 1997) und leistet so einen erheblichen Beitrag zum IRS. Ob ANP durch Inhibierung der MMP-Aktivität zum Schutz vor IRS beiträgt, wurde aus diesem Grund genauer überprüft.

Eine zusätzliche Arbeitshypothese, die im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht wurde, ergab sich aus sehr interessanten Befunden bei einer RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion) mit Primern des Housekeeping Genes **GAPDH** (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), die zur Standardisierung einer RT-PCR für HO-1 durchgeführt wurde. Dabei zeigten ANP-präkonditionierte Lebern eine deutliche Reduktion der GAPDH mRNA-Expression nach kalter Ischämie und während der Reperfusion. Da es Hinweise für eine erhöhte Expression der GAPDH mRNA nach Ischämie und nach oxidativem Stress gibt (Liedtke und Lynch, 1999; Ito *et al.*, 1996) und für GAPDH auch eine Rolle bei der Auslösung von Apoptose beschrieben wurde (Sirover, 1999), sollte der Einfluss von ANP auf die Expression von GAPDH und dessen Rolle beim Ischämie-Reperfusionsschaden näher betrachtet werden.

1.2 ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADEN DER LEBER

1.2.1 KLINISCHE BEDEUTUNG

Seit Thomas Starzl 1963 die erste Lebertransplantation am Menschen vornahm (Starzl, 1978), hat sich diese Technik zu einer etablierten Therapie für zahlreiche schwere Lebererkrankungen entwickelt. Im Laufe der Jahre stieg aufgrund der wachsenden Erfahrung, der Optimierung der Operationstechnik und des Einsatzes von Immunsuppressiva die Überlebensrate deutlich an und liegt heute ein Jahr nach dem Eingriff bei 85-90% (Keeffe, 2001).

Dennoch stellen die Folgen von Ischämie-Reperfusionsschäden (IRS) weiterhin ein großes klinisches Problem nach Lebertransplantationen, Leberresektionen und nach hämorrhagischem Schock dar (Bilzer und Gerbes, 2000). Bei Lebertransplantationen werden die Organe nach Entnahme bei 4°C in einer speziellen Konservierungslösung gelagert. Hierbei kommt es durch die Sauerstoffunterversorgung zu einer Aktivierung verschiedener Pathomechanismen und zu ersten Zellschädigungen. Man spricht auch von ischämischen Schaden. Ähnliches tritt bei Leberresektionen auf, bei denen man die Blutzufuhr temporär abklemmt, um die Operation blutungsärmer durchführen zu können (sog. Pringle-Manöver). Die in dieser Phase der kalten bzw. warmen Ischämie auftretenden Schäden werden in der Phase der Reperfusion, also der Phase, in der das Organ wieder mit sauerstoffreichem Blut versorgt wird, noch erheblich verstärkt (Blankensteijn und Terpstra, 1990; Clavien *et al.*, 1992; Rosser und Gores, 1995). Dies bezeichnet man entsprechend als Reperfusionsschaden. IRS tragen erheblich zu primärem Organversagen und Organdysfunktion bei, was in 5-15% der Fälle auftritt, und sind verantwortlich für erhöhte Morbidität und Mortalität. Hinzu kommt, dass aufgrund der auftretenden Schäden oft retransplantiert werden muss, was die Anzahl der zur Verfügung stehenden Organe stark verringert. Generell können sowieso nur zwei Drittel der Spenderorgane verwendet werden, da verfettete oder vorgeschädigte Lebern aufgrund ihrer höheren Empfindlichkeit gegenüber IRS nicht transplantiert werden können (Blankensteijn und Terpstra, 1990; Lemasters *et al.*, 1995).

Aus diesem Grund kommt der Aufklärung der am IRS beteiligten Pathomechanismen und der Suche nach therapeutischen Ansätzen zum Schutz vor IRS eine besondere Bedeutung zu. Ein besserer Schutz vor IRS könnte nicht nur das Auftreten und das Ausmaß schwerer

Komplikationen nach Lebertransplantationen und -resektionen deutlich senken, sondern auch die Anzahl der transplantierbaren Organe erhöhen.

1.2.2 PATHOMECHANISMEN

1.2.2.1 Ischämische Phase

Generell unterscheidet man zwei Arten der ischämischen Periode, die warme und die kalte Ischämie. Erstere spielt wie bereits erwähnt vor allem bei Leberresektionen eine Rolle, bei der die Blutzufuhr lediglich temporär abgeklemmt wird, kalte Ischämie tritt vor allem bei Lebertransplantationen auf. Die Pathomechanismen bei der kalten und warmen Ischämie sind sehr ähnlich, allerdings reagieren die verschiedenen Leberzelltypen unterschiedlich stark darauf. So scheinen bei kalter Ischämie vor allem die sinusoidalen Endothelzellen betroffen zu sein, während es bei warmer Ischämie vor allem zu Schäden an Hepatozyten kommt (McKeown *et al.*, 1988; Caldwell-Kenkel *et al.*, 1989). In beiden Zelltypen kommt es durch die Ischämie zu einer Verminderung der Zellatmung und somit zu einer ATP (Adenosintriphosphat)-Depletion. Dies führt zur Beeinträchtigung energieabhängiger metabolischer Abläufe und Transportprozesse und letztendlich zu einer Störung der Ionenhomöostase (Clavien *et al.*, 1992; Rosser *et al.*, 1995). Da Hypothermie die metabolischen Vorgänge in der Zelle herabsetzt und das Zeitintervall verlängert, in der sauerstoffverarmte Zellen lebenswichtige Funktionen aufrechterhalten können, wird bei Lebertransplantationen zunächst eine eiskalte Konservierungslösung in das Venen- und Arteriensystem des Organs infundiert. Die anschließende Lagerung erfolgt ebenfalls in der Kälte. Allerdings führt schon Hypothermie an sich zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumspiegel, zur Zellschwellung (Hansen *et al.*, 1994; Marsh *et al.*, 1989) und zur Apoptose (Kerkweg *et al.*, 2001). Die zur kalten Lagerung der Organe bevorzugt eingesetzte University of Wisconsin (UW) Lösung enthält unter anderem Lactobionat, das stark osmotisch wirksam ist und somit ein durch Hypothermie ausgelöstes Anschwellen der Zellen unterdrücken kann (Southard und Belzer, 1995). Lactobionat ist außerdem in der Lage, Zink- und Calciumionen zu chelatieren und übt dadurch einen inhibitorischen Effekt auf die calcium- und zinkabhängigen Matrix Metalloproteinasen (MMPs) aus, die während der Ischämie ebenfalls aktiviert werden und zu einer Ablösung der sinusoidalen Endothelzellen von der sie umgebenden Matrix führen (Takei *et al.*, 1990; Upadhyia *et al.*, 1997; Calmus *et al.*, 1995; siehe auch 1.2.3). Ein weiterer Pathomechanismus ist die Aktivierung sog.

Calpaine. Dies sind nicht-lysosomale calciumabhängige Cysteinproteasen, die Proteine des Zytoskeletts abbauen, was zur Membraninstabilität, einem Schlüsselereignis der Nekrose, führen kann (Saido *et al.*, 1994).

1.2.2.2 Reperfusions-Phase

Im Zentrum des Reperfusionsschadens nach warmer und nach kalter Ischämie steht die Aktivierung der Kupfferzellen (KC), der Makrophagen der Leber. Aktivierte KC setzen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in die Blutgefäße frei, die durch massive Schädigung der Zellen und durch Auslösung einer ganzen Kaskade von verschiedensten Mediatoren erheblich zum IRS beitragen (Jaeschke *et al.*, 1991; Jaeschke und Farhood, 1991). Die durch ROS vermittelte Lipidperoxidation spielt wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle (Mathews *et al.*, 1994). Vielmehr kommt es zu einer vermehrten Sekretion des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF) (Zhou *et al.*, 1992), von Interleukinen (IL) und des Tumor Nekrose Faktors- α (TNF- α) (Le Moine *et al.*, 1997), sowie zu einer Aktivierung der redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren AP-1 (Aktivator Protein-1) und NF- κ B (Nukleärer Faktor- κ B) (Kierner *et al.*, 2000). Dies alles führt zur Auslösung einer starken Entzündungsreaktion: Es kommt zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen und zu einer Infiltration von neutrophilen Granulozyten, die ihrerseits wieder zellschädigende ROS und Proteasen freisetzen (Jaeschke und Smith, 1997). Überdies kommt es in der frühen Phase der Reperfusion zu einer verstärkten Bildung des vasokonstriktorisch wirkenden Endothelin-1 (ET-1). Gleichzeitig sind die Konzentrationen von Stickstoffmonoxid (NO), einer vasodilatierend wirkenden Substanz, sehr niedrig, so dass es aufgrund dieses Ungleichgewichts zu Störungen der Mikrozirkulation kommen kann (Serracino-Ingloft *et al.*, 2001).

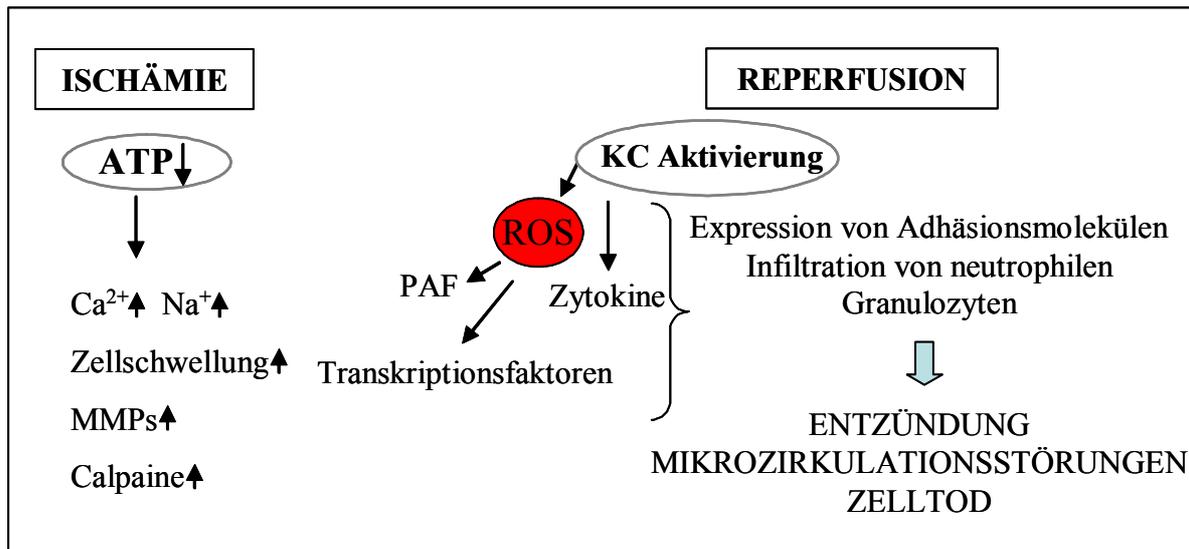


Bild 1.1: Wichtigste Pathomechanismen des Ischämie-Reperfusionsschadens
(Beschreibung siehe Text)

1.2.3 ROLLE DER MATRIX METALLOPROTEINASEN (MMPs) BEIM ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADEN

Da im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte, ob die hormonelle Präkonditionierung mit dem Atrialen Natriuretischen Peptid einen Einfluss auf die Aktivität der Matrix Metalloproteinasen hat, wird diese Enzymfamilie im Folgenden genauer vorgestellt.

1.2.3.1 Überblick

Bei den Matrix Metalloproteinasen (MMPs) handelt es sich um eine Familie von zink- und calciumabhängigen Endopeptidasen, die fähig sind, alle Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM), wie z.B. Kollagen, Proteoglykane, Fibronectin, Elastin oder Laminin abzubauen (Reviews: Nagase, 1997; Massova *et al.*, 1998; Westermarck und Kähäri, 1999; Chau *et al.*, 2003). Bei vielen physiologischen Prozessen ist dieser Abbau essentiell, damit wieder neues Gewebe entstehen kann. So spielen MMPs eine wichtige Rolle bei der Wundheilung, der Angiogenese und auch in der Schwangerschaft bei der Morphogenese und der Embryonalentwicklung. Allerdings sind sie auch an der Entstehung vieler Krankheiten und entzündlicher Prozesse beteiligt, bei denen es zur Zerstörung von Gewebe kommt, wie beispielsweise bei der rheumatoiden Arthritis und Osteoarthritis sowie bei Arteriosklerose und Multipler Sklerose. MMPs wird ebenfalls eine wesentliche Rolle bei Krebs

zugeschrieben, sowohl bei der Invasion maligner Zellen in gesundes Gewebe als auch beim Tumorwachstum und bei Tumor-induzierter Angiogenese (Woessner, 1994; Nagase, 1997). Auch zum Ischämie-Reperfusionsschaden tragen MMPs wesentlich bei (siehe 1.2.3.4). MMPs werden von einer Vielzahl von Zellen sezerniert, dazu gehören Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und auch Tumorzellen.

1.2.3.2 Struktur

Bisher wurden zwanzig verschiedene MMPs identifiziert. Man unterteilt sie in vier große Gruppen: Kollagenasen, Stromelysine, Gelatinasen und membrangebundene MMPs (MT-MMPs, mebrane-type MMPs) (Chau *et al.*, 2003). Einen Überblick gibt **Bild 1.2**.

Alle MMPs haben die gleiche Grundstruktur (Massova *et al.*, 1998). Die kleinste MMP ist das Matrilysin (MMP-7). Es besteht aus einem Signalpeptid, einem Propeptid und einer katalytischen Domäne mit einer Zn^{2+} -Bindungsstelle. Das Signalpeptid ist für die Translokation zum Endoplasmatischen Retikulum verantwortlich. Das N-terminale Propeptid besteht aus 77-87 Aminosäuren (AS), wovon ein Cystein über seine Thiolgruppe in der Seitenkette mit dem Zn^{2+} -Ion in der katalytischen Domäne interagiert. Diese Cystein-Zink Wechselwirkung ist dafür verantwortlich, dass die Matrix Metalloproteinase als Proenzym in einem inaktiven Zustand bleibt. Die katalytische Domäne enthält neben dem katalytischen Zn^{2+} noch ein weiteres Zinkion und zusätzlich ein Calciumion, beide liegen etwa 12 Å vom katalytischen Zn^{2+} entfernt.

Die Gelatinasen enthalten innerhalb der katalytischen Domäne eine Fibronectin-ähnliche Region, MMP-9 weist am C-Terminus zusätzlich noch einen Kollagen-ähnlichen Bereich auf. Diese beiden Regionen sind wahrscheinlich an der Bindung von Gelatine beteiligt.

Alle MMPs außer Matrilysin besitzen am C-Terminus eine konservierte Domäne, die in ihrer Struktur dem Hämopepin, einem Plasmaprotein, ähnlich ist. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Bindung von Substraten und körpereigenen Inhibitoren der MMPs, den sog. TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases).

Eine weitere Gruppe der MMPs, die MT-MMPs (membran-type MMPs), weisen als membrangebundene Enzyme am C-Terminus eine transmembrane Domäne auf, die aus ca. 25 AS besteht. Eine weitere Besonderheit ist eine zusätzliche kleine Sequenz am C-Terminus, die als Erkennungsstelle für Furin fungiert, einer Endopeptidase, die Vorstufen von Peptidhormonen, Neuropeptiden und vielen anderen Proteinen in deren biologisch aktive Form überführt. Diese Sequenz spielt speziell bei der Aktivierung von MT-MMPs eine Rolle.

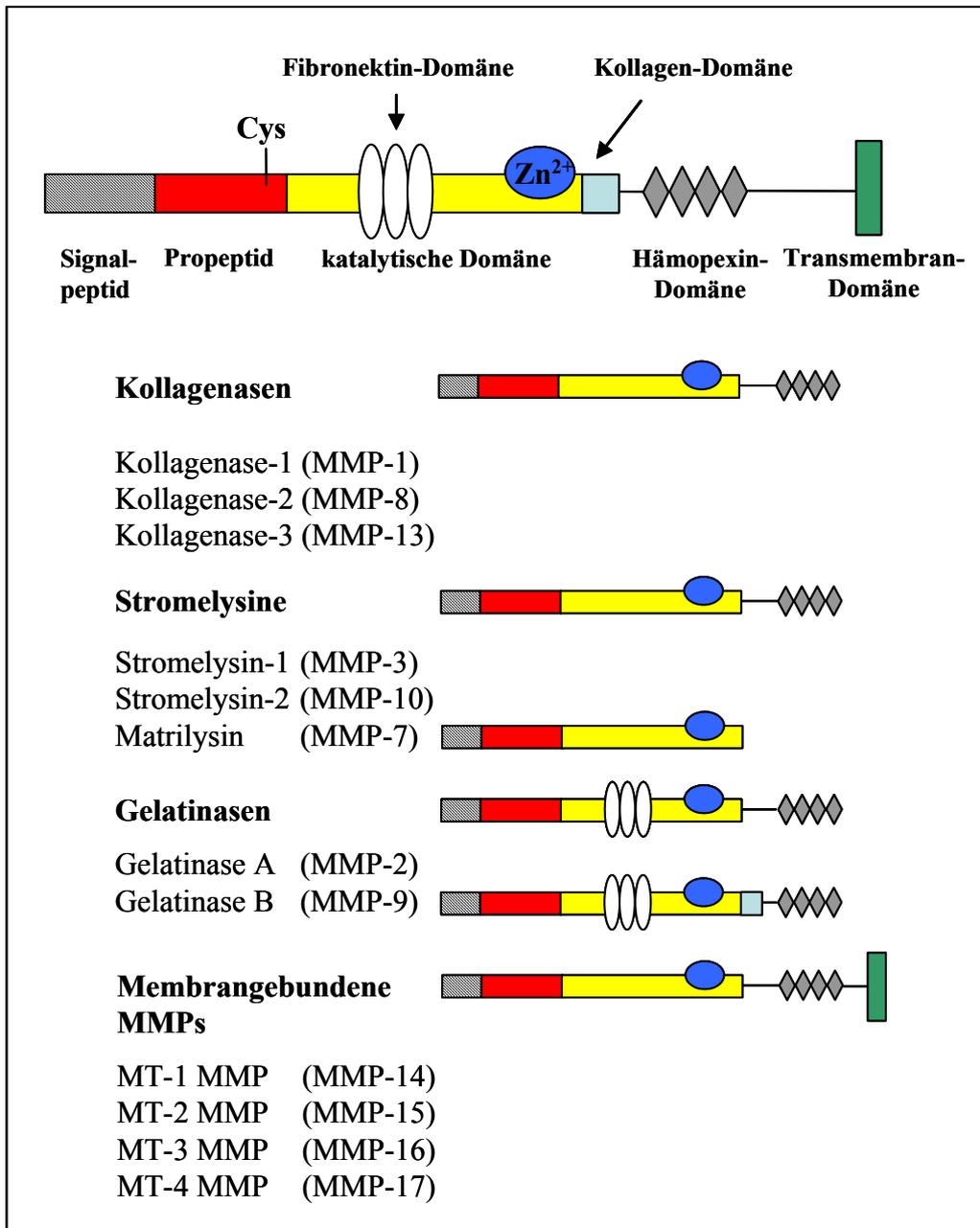


Bild 1.2: Struktur der Matrix Metalloproteinasen

1.2.3.3 Regulation der Aktivität

Die Aktivität der MMPs wird aufgrund ihrer wichtigen Funktionen im Körper sowohl transkriptionell als auch posttranskriptionell reguliert. Es handelt sich jeweils um sehr komplexe Vorgänge, an denen eine Vielzahl von Mediatoren beteiligt ist. Im Folgenden können daher nur die wichtigsten Regulationsmechanismen angesprochen werden.

Transkriptionelle Regulation:

Die Expression der MMPs erfolgt nicht konstitutiv, sondern wird durch eine Reihe von verschiedensten Faktoren ausgelöst. Dazu gehören z.B. Zytokine (Interferon- α , Interleukin-1, TNF- α) und Wachstumsfaktoren (Epidermal Growth Factor, Fibroblast Growth Factor), aber auch chemische (Colchicin, Lipopolysaccharid, Phorbol ester) und physikalische Reize (Hitzeschock, UV-Licht) (Chau *et al.*, 2003). Bei der intrazellulären Signaltransduktion spielen die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), eine Familie zytosolischer Serin/Threonin-Kinasen, die durch extrazelluläre Signale wie z.B. osmotischen Stress, Hitzeschock oder Zytokine aktiviert werden, eine wichtige Rolle. Sie können u.a. Transkriptionsfaktoren wie AP-1 phosphorylieren und so die Expression der MMPs beeinflussen (Westermarck und Kähäri, 1999). Die Promotorregionen der humanen MMP Gene enthalten neben der Bindungsstelle für AP-1 aber noch eine Vielzahl anderer regulatorischer Elemente.

Posttranskriptionelle Regulation (Bild 1.3):

Die meisten MMPs werden von den Zellen als inaktive Vorstufen, die als proMMPs oder Zymogene bezeichnet werden, in den Extrazellularraum sezerniert (Nagase, 1997). Dort können sie durch Abspaltung des Propeptids in die aktive Form überführt werden. Dies geschieht meist durch Proteasen wie z.B. Trypsin oder Plasmin, die das Propeptid zunächst in der Mitte spalten. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung und die bereits erwähnte Wechselwirkung des Cysteins in der Propeptidsequenz mit dem katalytischen Zn^{2+} wird dabei aufgehoben. Das Zinkion ist nun stattdessen mit einem Wassermolekül assoziiert. Dies ist der entscheidende Schritt bei der Aktivierung der MMPs. Er wird auch als Cystein-Switch bezeichnet. Anschließend wird das Propeptid komplett abgespalten. Dieser Schritt wird von einer anderen MMP katalysiert. Neben Proteasen können auch nicht-proteolytisch wirkende Substanzen wie z.B. SH-Reagenzien, Quecksilberverbindungen (4-Aminophenyl-

quecksilberacetat, APMA), denaturierende Substanzen wie z.B. Sodiumdodecylsulfat (SDS) oder Harnstoff die MMPs in ihre aktive Form überführen.

Es gibt aber auch MMPs, die innerhalb der Zelle aktiviert werden. Als Beispiel sei MT1-MMP, eine membrangebundene MMP, genannt, bei der das Propeptid durch Furin abgespalten wird.

Eine weitere Möglichkeit, die Aktivität der MMPs zu regulieren, ist die direkte Inhibition durch die körpereigenen, spezifischen tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). Bisher wurden vier verschiedene TIMPs identifiziert (Chau *et al.*, 2003). Sie bestehen aus zwei Domänen: Über die N-terminale Domäne können sie an das aktive Zentrum der MMPs binden, die C-terminale Region ermöglicht die Bindung an den C-Terminus bestimmter MMPs.

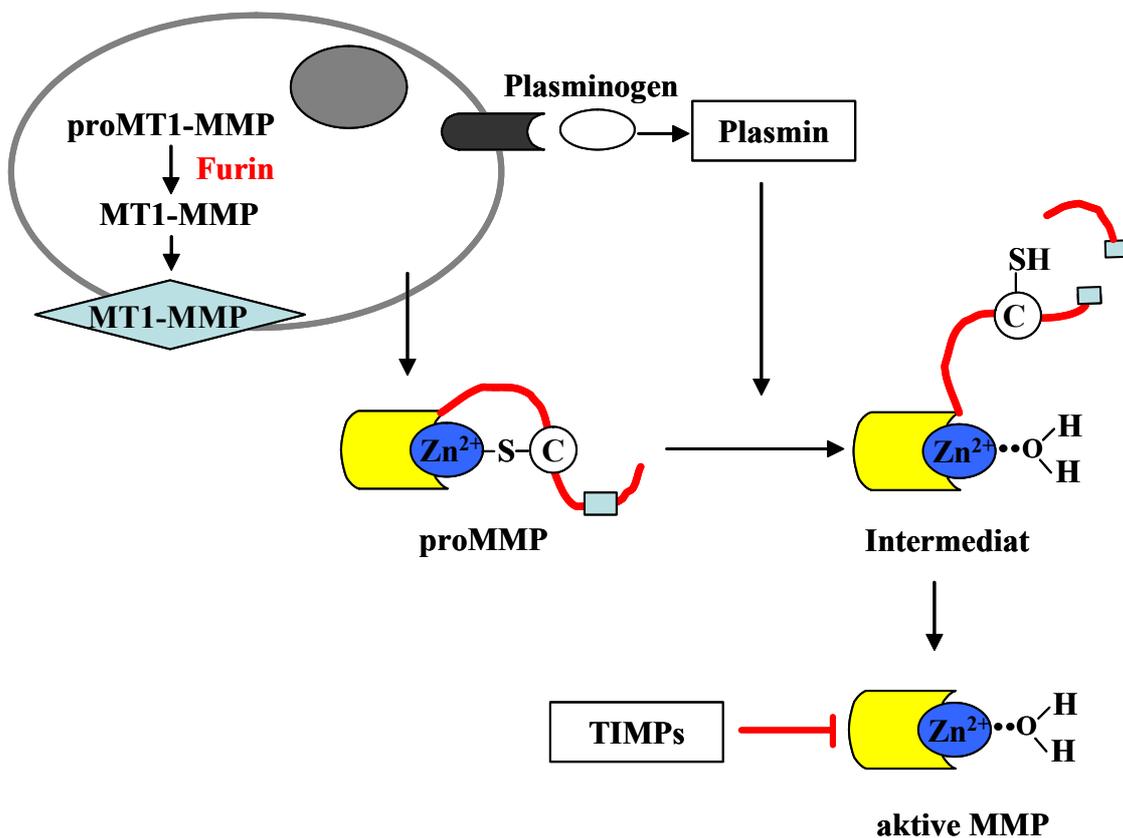


Bild 1.3: Posttranskriptionelle Regulation der Matrix Metalloproteinasen
(Beschreibung siehe Text)

1.2.3.4 Rolle beim Ischämie-Reperfusionsschaden in der Leber

Eine mögliche Beteiligung der MMPs am Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber nach kalter Ischämie wurde erstmals 1997 von Upadhy *et al.* beschrieben (Upadhy *et al.*, 1997). Er konnte in den Eluaten, die zu Beginn der Reperfusion von Ratten- und Menschenlebern gesammelt wurden, die Anwesenheit verschiedener MMPs nachweisen. Den Hauptanteil machten die beiden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 aus. Da es nach kalter Ischämie zu einer Ablösung der sinusoidalen Endothelzellen von der sie umgebenden Matrix kommt (McKeown *et al.*, 1988; Fratte *et al.*, 1991) und MMPs Bestandteile der Extrazellulären Matrix, wie z.B. Kollagen und Fibronectin, abbauen können, können sie am Schaden nach Ischämie-Reperfusion beteiligt sein. Bisher gibt es nur eine Publikation, die einen kausalen Zusammenhang zwischen der Aktivierung von Matrix Metalloproteinasen und dem IRS in der Rattenleber zeigt: Cursio *et al.* konnten durch Gabe eines spezifischen MMP-Inhibitors die Aminotransferase und Lactatdehydrogenase-Level nach warmer Ischämie senken und auch das Auftreten von Apoptose und Nekrose deutlich verringern (Cursio *et al.*, 2002). Yang *et al.* verminderten *in vitro* durch Inhibierung der MMPs die durch Hypothermie und Hypoxie ausgelöste Apoptose von sinusoidalen Leberendothelzellen (Yang *et al.*, 2002). Desweiteren konnte nachgewiesen werden, dass Lactobionat und Glutathion, zwei wichtige Bestandteile der UW-Lösung, die Aktivität der MMPs herabsetzen (Upadhy und Strasberg, 2000) und dass UW-Lösung den Schaden an sinusoidalen Endothelzellen im Vergleich zu anderen Konservierungslösungen vermindert (Holloway *et al.*, 1989). Von welchen Leberzellen die MMPs sezerniert werden, ist noch nicht bekannt. Gezeigt wurde bereits, dass Sternzellen und Kupfferzellen die beiden Gelatinasen in den Extrazellularraum sezernieren können (Arthur *et al.*, 1989; Winwood *et al.*, 1995). Aber auch sinusoidale Endothelzellen selbst könnten eine Quelle für MMPs sein (Upadhy *et al.*, 1997).

1.2.4 PRÄVENTION DES ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADENS

1.2.4.1 Überblick

Bisher wurden zahlreiche Therapieansätze zum Schutz vor Ischämie-Reperfusionsschäden untersucht. Einige Maßnahmen, die hauptsächlich die Aufbewahrung der Organe vor der Transplantation betreffen, sind bereits etabliert. So hat sich z.B. die UW-Lösung als Konservierungslösung bei Transplantationen der Leber, Niere, Lunge und des Herzens im

Vergleich zur früher verwendeten Euro-Collins Lösung aufgrund vorteilhafterer Eigenschaften durchgesetzt (Southard *et al.*, 1995). Lactobionat und Glutathion, zwei wichtige Bestandteile der UW-Lösung, sind für deren protektive Wirkung verantwortlich. Lactobionat ist, wie bereits erwähnt, stark osmotisch wirksam und kann daher ein durch Hypothermie verursachtes Anschwellen der Zellen unterdrücken (Southard *et al.*, 1995), Glutathion schützt aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften.

Neben diesen bereits etablierten Methoden gibt es eine Reihe neuer Therapieansätze, die intensiv untersucht werden. Einige davon, wie z.B. die Präkonditionierung mit dem Atrialen Natriuretischen Peptid (ANP) oder mit α -Liponsäure sowie die Ischämische Präkonditionierung, die im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht worden sind, werden in den folgenden Kapiteln genauer erläutert.

Ein weiterer Ansatz zur Prävention der IRS ist der Einsatz von Antioxidantien, um den durch ROS vermittelten Schaden zu verringern. So konnte die Gabe verschiedener Antioxidantien während der frühen Phase der Reperfusion den IRS vermindern: Glutathion (Bilzer *et al.*, 1999a), Allopurinol (Kusumoto *et al.*, 1995), N-Acetylcystein (Koeppel *et al.*, 1996) und α -Tocopherol (Marabayashi *et al.*, 1986) zeigen protektive Effekte.

Außerdem wirkt sich die Blockade proinflammatorischer Mediatoren wie z.B. TNF- α und Interleukin-1 (Coletti *et al.*, 1990; Shito *et al.*, 1997) oder von Adhäsionsmolekülen (Farhood *et al.*, 1995) positiv aus.

Auf einem ganz anderen protektiven Mechanismus beruht die Präkonditionierung mit Doxorubicin, einer Substanz, die normalerweise zur Chemotherapie von malignen Lymphomen und Leukämie eingesetzt wird. Es konnte gezeigt werden, dass Doxorubicin zu einer Induktion der zytoprotektiven Hämoxxygenase-1 (HO-1) führt und somit den IRS verringert (Ito *et al.*, 2000).

1.2.4.2 Hormonelle Präkonditionierung mit dem Atrialen Natriuretischen Peptid

Die protektive Wirkung des Atrialen Natriuretischen Peptids (ANP), eines zirkulierenden kardiovaskulären Hormons, das vor allem an der Regulation des Gefäßtonus und des Wasser- und Salzhaushaltes beteiligt ist (Levin *et al.*, 1998), wurde zuerst an der Niere beschrieben (Shaw *et al.*, 1987; Nakamoto *et al.*, 1987).

Später konnte dann gezeigt werden, dass eine Präkonditionierung mit ANP auch vor IRS in der Rattenleber sowohl nach warmer (Bilzer *et al.*, 1994) als auch nach kalter Ischämie (Gerbes *et al.*, 1998) schützt: Die Freisetzung von Lactatdehydrogenase, einem Parameter für

das Ausmaß des Zelltods, ist bei ANP-präkonditionierten Lebern geringer. Außerdem ist der Gallefluss, ein wichtiger Parameter der Leberfunktion, nach der Ischämie erhöht. Die protektiven Effekte scheinen über den Natriuretischen Peptid Rezeptor-A (NPR-A) vermittelt zu werden (Gerbes *et al.*, 1998), einem Guanylatzyklase-gekoppelten Rezeptor, der nach Aktivierung die intrazellulären Spiegel des second messengers cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat) erhöht. Die beschriebenen ANP-Effekte können durch Präkonditionierung mit dem cGMP-Analogon 8-Br-cGMP imitiert werden (Gerbes *et al.*, 1998).

Es gibt bisher einige Untersuchungen darüber, welche Signalwege an der Vermittlung des protektiven Effekts von ANP beteiligt sein könnten: So kann ANP in der isoliert perfundierten Rattenleber die Aktivität der redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B reduzieren und dadurch die Expression der TNF- α mRNA verringern, einem Zytokin, das ebenfalls zum Schaden nach Ischämie und Reperfusion beiträgt (Kierner *et al.*, 2000). Außerdem ist es in der Lage, die Rattenleber vor Kupfferzell-induziertem oxidativen Stress zu schützen (Bilzer *et al.*, 1999b), den heat shock transcription factor (HSF) zu aktivieren und das heat shock Protein HSP70 zu induzieren (Kierner *et al.*, 2002c). HSP70 scheint vor IRS zu schützen, indem es die Faltung neu entstehender oder partiell denaturierter Proteine erleichtert (Becker und Craig, 1994) und die inflammatorische Antwort während der Reperfusion unterdrückt (Scarim *et al.*, 1998). Präkonditionierung mit ANP kann auch apoptotischen und nekrotischen Zelltod nach kalter Ischämie und während der Reperfusion reduzieren. Dieser Effekt wird durch Einsatz eines Inhibitors der cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat)-abhängigen Proteinkinase aufgehoben (Gerwig, 2002), so dass anzunehmen ist, dass ANP seine protektiven Effekte über eine Aktivierung der Proteinkinase A vermittelt.

1.2.4.3 Präkonditionierung mit α -Liponsäure

α -Liponsäure (synonym 6,8-Dithiooctansäure) (**Bild 1.4**) ist eine in Pflanzen, Tieren und Menschen vorkommende natürliche Substanz, die 1951 von Reed und seinen Mitarbeitern erstmals isoliert wurde (Reed *et al.*, 1951). Es handelt sich um eine Carbonsäure aus acht Kohlenstoffatomen mit einem zyklischen Disulfid und einem Chiralitätszentrum. Das R-Enantiomer ist die natürlich vorkommende Form.

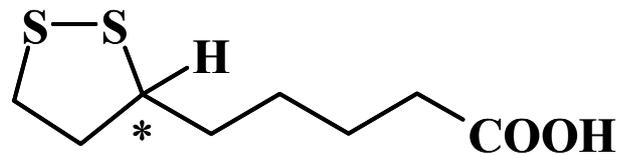


Bild 1.4: Strukturformel von α -Liponsäure

Als Lipoamid fungiert α -Liponsäure als Kofaktor in dem Multienzymkomplex, der die oxidative Decarboxylierung von α -Ketosäuren wie z.B. Pyruvat oder α -Ketoglutarat in Mitochondrien katalysiert. Durch Bereitstellung von Acetyl-CoA für den Citratzyklus spielt es eine große Rolle bei der Energiegewinnung der Zelle.

In vitro zeigt α -Liponsäure antioxidative Eigenschaften, indem es ROS, wie z.B. Hydroxylradikale, hypochlorige Säure, Peroxynitrit oder Singulett-Sauerstoff abfängt oder stabile Komplexe mit Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} und Fe^{2+} bildet (Biewenga *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1991; Biewenga und Bast, 1995; Packer *et al.*, 1995). Außerdem kann Dihydroliponsäure, die im Körper durch Reduktion von α -Liponsäure entsteht, die Synthese von Glutathion steigern, indem es Cystein durch die Reduktion von Cystin für die Glutathion-Synthese bereitstellt (Han *et al.*, 1997). Diese antioxidativen Eigenschaften sind ein Grund, warum α -Liponsäure zur Therapie der diabetischen Polyneuropathie eingesetzt wird (Coleman *et al.*, 2001), bei der unter anderem oxidativer Stress zur Nervenschädigung führt. Ein weiterer Grund ist, dass α -Liponsäure die Glukoseaufnahme in die Zelle steigern kann. Dabei spielt die Translokation von Glukosetransportern sowie eine Induktion der Phosphatidylinositol-3-kinase- (PI3-K) und Akt-Aktivität durch Liponsäure eine große Rolle (Konrad *et al.*, 2001). Akt, eine Serin-/Threoninkinase, die durch das von der PI3-K gebildete Phosphatidylinositol aktiviert werden kann, ist u.a. ein sehr wichtiger Mediator der physiologischen Effekte von Insulin und kann die Aufnahme von Glukose in die Zelle stimulieren.

Auch bei verschiedensten Erkrankungen der Leber, wie z.B. bei Vergiftungen mit Pilzen, Cd^{2+} oder auch bei durch Alkohol verursachten Leberschäden, wurde für α -Liponsäure eine therapeutische Wirkung beschrieben (Cohen *et al.*, 1971; Müller und Menzel, 1990; Bludovska *et al.*, 1999; Bustamante *et al.*, 1998).

Beim Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber ist eine Präkonditionierung mit α -Liponsäure ebenfalls protektiv (Müller *et al.*, in Revision). Dies äußert sich in einem verminderten Efflux von Lactatdehydrogenase und Purin-Nukleosid-Phosphorylase aus sinusoidalen Endothel-

zellen in mit α -Liponsäure präkonditionierten Lebern. α -Liponsäure steigert außerdem in der isoliert perfundierten Rattenleber den ATP-Gehalt in den Zellen deutlich, wodurch energieabhängige metabolische Abläufe und Transportprozesse weniger beeinträchtigt sein könnten. Außerdem ist die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B in den mit α -Liponsäure behandelten Organen geringer. Dies könnte die Entzündungsreaktion der Leber in der Reperfusion vermindern. Einen ganz wesentlichen Beitrag zum Schutz vor IRS leistet α -Liponsäure jedoch durch Aktivierung der Akt. Dieser Proteinkinase werden zytoprotektive Eigenschaften, wie z.B. Schutz von Zellen vor Apoptose, nachgesagt (Leslie *et al.*, 2001). Blockade der Akt-Aktivierung durch den selektiven PI3-K Inhibitor Wortmannin konnte den durch α -Liponsäure vermittelten Schutz aufheben (Müller *et al.*, in Revision).

1.2.4.4 Ischämische Präkonditionierung

Ein oder mehrere kurze Ischämieintervalle (2-10 min) mit anschließender Reperfusion können Organe gegenüber IRS unempfindlicher machen. Diese chirurgische Vorgehensweise bezeichnet man auch als Ischämische Präkonditionierung. Sie wurde erstmals 1986 von Murry und seinen Mitarbeitern am Herzen beschrieben (Murry *et al.*, 1986). Inzwischen wurde der protektive Effekt der Ischämischen Präkonditionierung jedoch auch in vielen anderen Organen gezeigt, wie z.B. im Gehirn (Glazier *et al.*, 1994), im Darm (Hotter *et al.*, 1996) und auch in der Leber sowohl nach warmer (Peralta *et al.*, 1997) als auch nach kalter (Yin *et al.*, 1998; Arai *et al.*, 1999) Ischämie. Der schützende Effekt entsteht innerhalb der ersten Minuten der Reperfusion und hält zunächst 2-3 h an. Nach 12-24 h zeigt sich eine weitere Schutzwirkung, die im Gegensatz zu den zu Beginn der Reperfusion ausgelösten Schutzmechanismen auf einer veränderten Genexpression und Synthese neuer protektiver Proteine beruht (Korthius *et al.*, 1998; Bolli, 2000). Da die meisten Untersuchungen zur Signaltransduktion der Ischämischen Präkonditionierung am Herzen vorgenommen wurden, werden die wichtigsten in diesem Organ beteiligten Mechanismen im Folgenden vorgestellt (**Bild 1.5**). Welche dieser Mechanismen bisher in der Leber untersucht wurden, wird weiter unten aufgeführt.

Man geht davon aus, dass es sich bei der frühen Phase der Ischämischen Präkonditionierung um einen rezeptormedierten Vorgang handelt, bei dem vor allem G-Protein-gekoppelte Adenosin-, Bradykinin- und Opioidrezeptoren beteiligt sind (Schulz *et al.*, 2001). Adenosin kommt dabei als Auslöser der Präkonditionierung die größte Bedeutung zu. Adenosin ist ein Abbauprodukt von ATP, das innerhalb weniger Sekunden nach Beginn der Ischämie in den

Extrazellularraum freigesetzt wird. Es entfaltet seine physiologischen Effekte über vier verschiedene G-Protein-gekoppelte purinerge Rezeptoren (A_1 , A_{2a} , A_{2b} , A_3), wobei vor allem der A_1 - und A_2 -Rezeptor an der Ischämischen Präkonditionierung beteiligt sind (Cohen *et al.*, 2000). Nach Bindung von Adenosin kommt es zu einer Aktivierung der membrangebundenen Phospholipase C oder D (PLC/PLD) durch das G-Protein. Die Phospholipasen spalten Phosphatidylinositolbiphosphat (PIP₂) in Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG), das letztendlich bestimmte Isoformen der Proteinkinase C (PKC) aktiviert (Speechly-Dick *et al.*, 1994). PKC kann nun verschiedenste Targetproteine phosphorylieren und so zum Schutz vor IRS beitragen. Ein wichtiges Target sind die mitochondrialen ATP-abhängigen Kalium-Kanäle. Eine Öffnung dieser Kanäle kann die Integrität der Mitochondrien erhalten, da ein erhöhter Einstrom von Calcium verhindert wird. Außerdem kommt es durch Zunahme des Matrixvolumens zu einer verstärkten Respiration (Gross und Fryer, 1999). Als downstream target der PKC wird auch die p38 MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)-Kaskade als protektiver Mechanismus diskutiert (Ping und Murphy, 2000).

In der Spätphase der Ischämischen Präkonditionierung steht eine veränderte Genexpression und Neusynthese protektiver Proteine im Vordergrund. Diskutiert wird eine mögliche Beteiligung des Transkriptionsfaktors (TF) NF- κ B, der nach Translokation in den Kern die Expression protektiver Gene induzieren kann (Maulik *et al.*, 1998; Xuan *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000). Außerdem nimmt man an, dass Cyclooxygenase-2 (COX-2), das antioxidativ wirkende Enzym Mangan-Superoxiddismutase (Mn-SOD) und auch heat shock Proteine (HSP) am Schutz beteiligt sind (Bolli, 2000; Carrol und Yellon, 1999).

Kürzlich wurde von Berenshtein *et al.* auch eine Beteiligung von Ferritin und Eisen an der Ischämischen Präkonditionierung im Herzen diskutiert (Berenshtein *et al.*, 2002). Seine Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass es in ischämisch präkonditionierten Rattenherzen einerseits zu einer geringeren Umverteilung und Mobilisierung von Eisen kommt, das in hohen Konzentrationen zum Schaden beiträgt, und andererseits die Expression von Ferritin erhöht ist. Außerdem war die Sättigung von Ferritin mit Eisen in präkonditionierten Herzen geringer. In der Leber wurde eine Induktion von Ferritin als möglicher protektiver Mechanismus bisher nicht beschrieben und wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals untersucht.

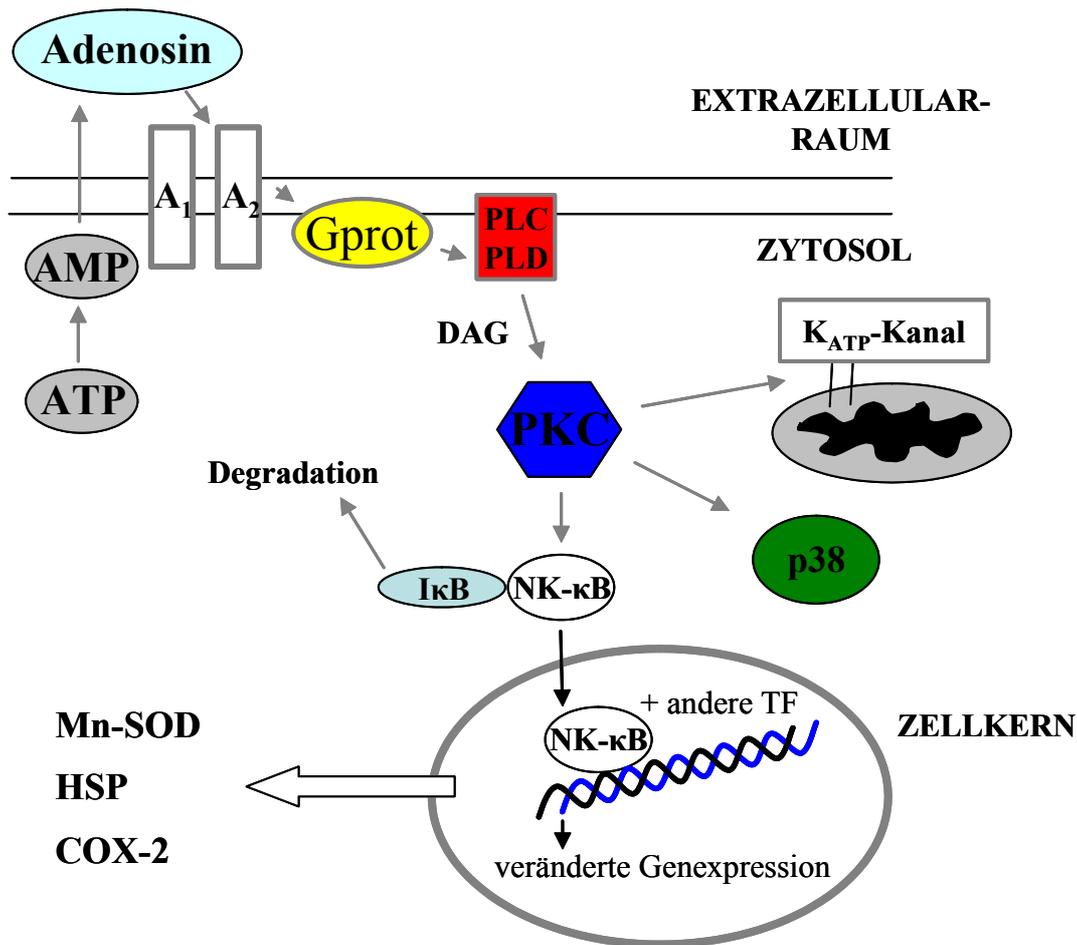


Bild 1.5: Mögliche Signaltransduktion bei der Ischämischen Präkonditionierung
(Beschreibung siehe Text)

Auch über mögliche andere Signaltransduktionswege, die in der Leber am Schutz durch Ischämische Präkonditionierung beteiligt sind und die im Folgenden kurz dargestellt werden, ist noch wenig bekannt. Peralta *et al.* konnten zeigen, dass Adenosin A₂-Rezeptoren am Schutz durch Ischämische Präkonditionierung beteiligt sind (Peralta *et al.*, 1999). Carini *et al.* nahmen Versuche an hypoxisch präkonditionierten Rattenhepatozyten vor und postulieren einen Signaltransduktionsweg, in den ebenfalls A₂-Rezeptoren, aber auch G-Proteine, PLC, PKC und p38 MAPK involviert sind (Carini *et al.*, 2001). Eine Inhibierung der PKC konnte auch *in vivo* den Schutz durch Ischämische Präkonditionierung aufheben (Ricciardi *et al.*, 2001). Ein ganz anderer Mechanismus wird von Schauer *et al.* diskutiert. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Ischämische Präkonditionierung die Lebern vor oxidativem Stress aus Kupfferzellen schützt. Dieser Effekt wird allerdings weder durch einen A₂-Rezeptorantagonist aufgehoben noch durch einen A₂-Rezeptoragonist nachgeahmt (Schauer *et al.*, 2003).

Als weiterer protektiver Mechanismus der Ischämischen Präkonditionierung wird auch eine verminderte Umwandlung von Xanthindehydrogenase in Xanthinoxidase diskutiert, ein Enzym, das in der Reperfusion ROS generieren kann (Fernandez *et al.*, 2002). Bezüglich NF- κ B gibt es kontroverse Befunde: Teoh *et al.* postulieren, dass eine Aktivierung von NF- κ B und p38 protektiv wirken (Teoh *et al.*, 2002), Funaki *et al.* konnten dagegen zeigen, dass Ischämische Präkonditionierung die NF- κ B-Aktivität und die TNF- α -Expression verringert (Funaki *et al.*, 2002).

1.3 DAS ATRIALE NATRIURETISCHE PEPTID

Im Jahr 1981 beobachteten de Bold und seine Kollegen, dass die Infusion von Extrakten aus Atriumgewebe des Herzens in Ratten starke Natriurese, Diurese und Blutdruckabfall auslöste (de Bold *et al.*, 1981). Dies führte zur Isolierung und Klonierung des Atrialen Natriuretischen Peptids (ANP), dem ersten Mitglied einer Familie von Natriuretischen Peptiden (NP) (de Bold, 1982 und 1985), das von den Myozyten im Vorhof des Herzens aus zytosolischen Granula in die Zirkulation sezerniert wird und natriuretische, diuretische sowie vasorelaxierende Eigenschaften besitzt (Levin *et al.*, 1998). Neben seiner Wirkung auf das Herz-Kreislauf-System konnten für ANP jedoch auch andere biologische Funktionen nachgewiesen werden. So zeigt es z.B. *in vitro* antiinflammatorische Eigenschaften, indem es die Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), eines proinflammatorischen Enzyms, vermindert (Kierner und Vollmar, 1997; Kierner und Vollmar, 1998; Kierner und Vollmar, 2001a; Kierner und Vollmar, 2001b) und in der Lage ist, Endothelzellen vor TNF- α -induzierter Erhöhung der Endothelpermeabilität zu schützen (Kierner *et al.*, 2002a). Außerdem kann ANP die durch Lipopolysaccharid (LPS) ausgelöste Induktion von Cyclooxygenase-2, einem wichtigen inflammatorischen Enzym, in Makrophagen verringern (Kierner *et al.*, 2002b).

Auch zytoprotektive Eigenschaften von ANP wurden in der Literatur beschrieben: So kann durch Gabe von ANP die Nierenfunktion nach renaler Ischämie und Reperfusion aufrechterhalten werden (Nakamoto *et al.*, 1987; Shaw *et al.*, 1987).

Die protektive Wirkung der hormonellen Präkonditionierung mit ANP beim Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber wurde bereits unter 1.2.4.2 erwähnt.

1.3.1 NATRIURETISCHE PEPTIDE

Nach Entdeckung des ersten Natriuretischen Peptids, ANP, wurden weitere, strukturell ähnliche Peptide gefunden und näher charakterisiert (Levin *et al.*, 1998).

Matsuo und seine Mitarbeiter isolierten BNP (Brain oder B-Typ Natriuretisches Peptid) und CNP (C-Typ Natriuretisches Peptid) aus Schweinehirnen (Sudoh *et al.*, 1988 und 1990). Urodilatin, das ausschließlich in der Niere gebildet wird, wurde erstmals aus humanem Urin isoliert (Schulz-Knappe *et al.*, 1988). Erst kürzlich wurde DNP (*Dendroaspis* Natriuretisches Peptid), das ursprünglich aus dem Gift der grünen Mambaschlange, *Dendroaspis angusticeps*, isoliert wurde, im humanen Plasma und im atrialen Myokard nachgewiesen (Schirger *et al.*, 1999).

Alle Natriuretischen Peptide weisen eine Ringstruktur aus 17 Aminosäuren (AS) auf, die durch eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinresten gebildet wird (Currie *et al.*, 1984). Diese Struktur ist essentiell für ihre biologische Aktivität (Misono *et al.*, 1984). Elf der zyklischen Aminosäuren sind in jedem der Natriuretischen Peptide homolog, die Anzahl und die Art der Aminosäuren am C- und am N-Terminus unterscheiden sich dagegen.

ANP wird hauptsächlich im Atrium des Herzens gebildet, seine mRNA kodiert eine Vorstufe des physiologisch aktiven ANP, das sog. prä-pro-ANP, das aus insgesamt 152 Aminosäuren besteht. Nach Abspaltung eines Signalpeptids am N-Terminus entsteht pro-ANP mit 126 AS, das in atrialen Granula gespeichert wird (Rosenzweig und Seidman, 1991). Diese Vorstufe wird anschließend proteolytisch gespalten, wobei ein aminoterminales Fragment aus 98 AS (ANP 1-98) und das biologisch aktive Hormon ANP (ANP 99-126, **Bild 1.6**), das aus den restlichen 28 AS besteht, gebildet werden (Rosenzweig und Seidman, 1991). Die Sekretion von ANP in die Zirkulation erfolgt über Exozytose (Nemer *et al.*, 1984). Die Biosynthese der anderen Natriuretischen Peptide verläuft ähnlich.

BNP ist ein zyklisches Peptid aus 32 AS und wird vor allem in den Ventrikeln des Herzens gebildet, wo es z.B. bei dekompensierter Herzinsuffizienz vermehrt produziert wird (Langenickel *et al.*, 2000). Es hat ähnliche Wirkungen wie ANP. Im Jahr 2001 wurde in den USA humanes, rekombinantes BNP (Natrecor[®]) von der Food and Drug Administration zur Therapie der akuten, dekompensierten kongestiven Herzinsuffizienz zugelassen.

CNP, das mit 22 AS am C-Terminus nach dem letzten an der Ringbindung beteiligten Cystein endet (Rosenzweig und Seidman, 1991), wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert, besitzt allerdings keine natriuretischen Eigenschaften, sondern ist überwiegend vasorelaxierend (Levin *et al.*, 1998).

Das aus 38 AS bestehende **DNP** hat vor allem natriuretische Wirkung (Lisy *et al.*, 1999).

Urodilatin, welches nur in der Niere produziert wird und dort für die Regulation des Natrium- und Wasserhaushaltes zuständig ist, unterscheidet sich von ANP nur durch vier zusätzliche AS am aminoterminalen Ende (Schulz-Knappe *et al.*, 1988).

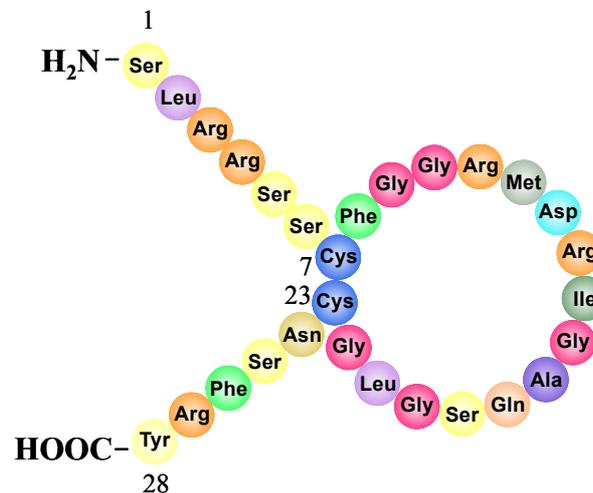


Bild 1.6: Struktur und Aminosäuresequenz von ANP

1.3.2 DIE NATRIURETISCHEN PEPTIDREZEPTOREN UND IHRE SIGNALTRANSDUKTION

1.3.2.1 Aufbau der Rezeptoren

Bisher wurden insgesamt drei verschiedene Natriuretische Peptidrezeptoren (NPR) identifiziert, über die die Natriuretischen Peptide ihre Effekte vermitteln, NPR-A, NPR-B und NPR-C (Levin *et al.*, 1998; Venugopal, 2001) (**Bild 1.7**).

NPR-A und NPR-B sind Guanylatzyklase (GC) gekoppelte Rezeptoren, die aus einer extrazellulären Peptidbindungsstelle, einer kurzen transmembranären Sequenz und zwei intrazellulären Domänen bestehen. Davon besitzt eine Domäne Proteinkinase-ähnliche Aktivität, die andere Guanylatzyklase-Aktivität. ANP und BNP binden an den NPR-A Rezeptor, ersteres jedoch mit wesentlich höherer Affinität. CNP hat eine sehr hohe Affinität zum NPR-B Rezeptor. Eine Bindung der Natriuretischen Peptide bewirkt in beiden Fällen eine Aktivierung der Guanylatzyklase und somit eine Erhöhung der intrazellulären Spiegel des second messengers cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat). Die NP vermitteln den Großteil ihrer Effekte über diese beiden Rezeptoren.

Der NPR-C Rezeptor weist eine andere Struktur auf, seine extrazelluläre Domäne ist den anderen Rezeptoren ähnlich, doch er besitzt nur eine kurze intrazelluläre Sequenz ohne Guanylatzyklase-Aktivität. Alle NP binden mit hoher Affinität an den NPR-C Rezeptor, der vor allem an deren Clearance beteiligt ist. Nach Bindung der NP werden diese in die Zelle internalisiert und enzymatisch abgebaut. Neben seinen regulatorischen Funktionen als Clearance-Rezeptor nimmt man an, dass der NPR-C Rezeptor die Adenylatzyklase-Aktivität inhibieren und Proteinkinase C aktivieren kann (Palaparti und Anand-Srivastava, 2000). Möglicherweise können einige der NPR-C vermittelten Effekte, wie die Hemmung der Endothelin-Produktion (Hu *et al.*, 1992) oder die Hemmung der Astrozyten-Proliferation (Levin und Frank, 1991), darauf zurückgeführt werden.

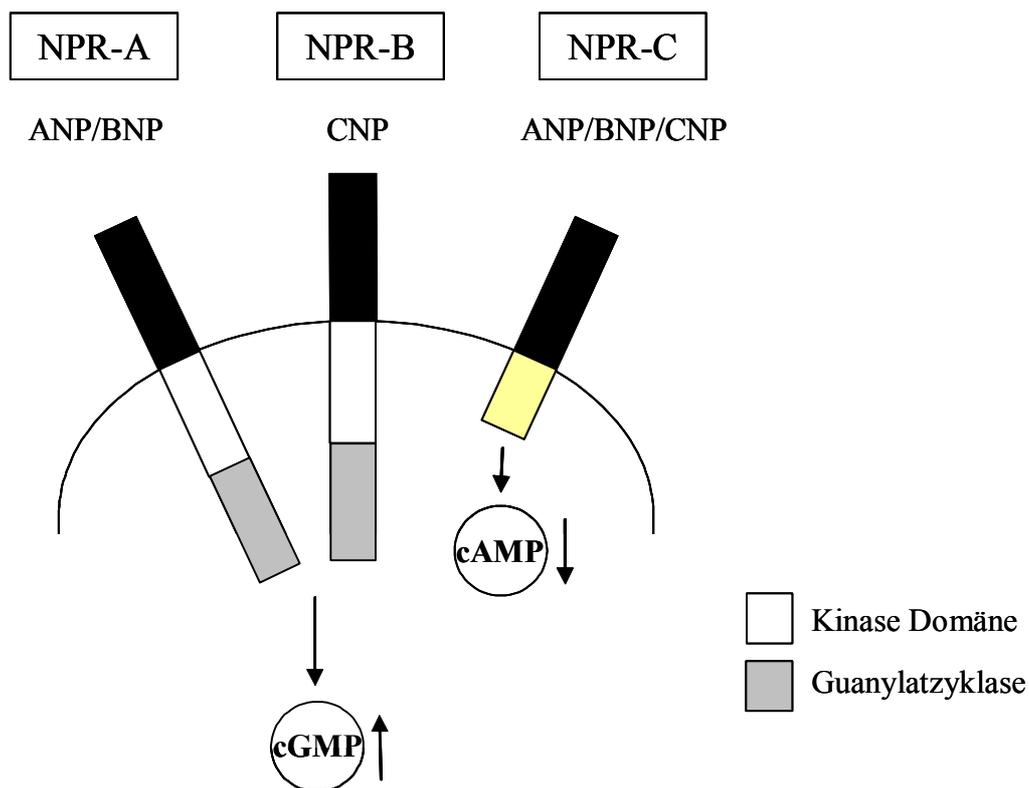


Bild 1.7: Die Natriuretischen Peptidrezeptoren und ihre Signaltransduktion
(Beschreibung siehe Text)

1.3.2.2 cGMP-abhängige Signaltransduktion in der Leber

Die Natriuretischen Peptidrezeptoren sind in Säugetieren in vielen verschiedenen Geweben zu finden, vor allem aber im kardiovaskulären System, in der Nebenniere und der Niere (Silberbach und Roberts, 2001). Alle drei Rezeptoren konnten auch in der Leber identifiziert werden (Vollmar *et al.*, 1997a).

Nach Bindung der NP an den NPR-A oder NPR-B Rezeptor wird die Guanylatzyklase aktiviert und intrazelluläres cGMP gebildet. Dieses wiederum dient als second messenger und kann im Folgenden seine regulatorischen Funktionen über cGMP-abhängige Proteine ausüben. Ein Hauptangriffspunkt von cGMP sind die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKGs) (Lohmann *et al.*, 1997; Pfeiffer *et al.*, 1999), die die Aktivität zahlreicher Proteine regulieren, indem sie den Transfer einer Phosphatgruppe von ATP auf einen Serin- oder Threoninrest eines Zielproteins katalysieren (Francis und Corbin, 1994 und 1999). Ob in der Leber PKGs exprimiert werden, ist umstritten. Einige Arbeitsgruppen konnten keine oder nur eine geringe Expression von PKGs nachweisen (Jarchau *et al.*, 1994; Tamura *et al.*, 1996; Sandberg *et al.*, 1989), Carini *et al.* wiesen in isolierten Hepatozyten jedoch PKG-Aktivität nach (Carini *et al.*, 2003). In unserem Modell der isoliert perfundierten Rattenleber konnte keine Expression von PKGs detektiert werden. Außerdem konnte der Schutz vor Apoptose durch ANP-Präkonditionierung durch Gabe eines spezifischen PKG-Inhibitors nicht aufgehoben werden (Gerwig, 2002; siehe auch 1.2.4.2).

Andere Angriffspunkte von cGMP sind cAMP-abhängige Proteinkinasen (PKAs), die cGMP entweder in höheren Konzentrationen direkt aktivieren (Cornwell *et al.*, 1994) oder über eine Veränderung der cAMP-Spiegel durch Induktion oder Inhibierung von bestimmten Phosphodiesterasen (PDEs), die für den Abbau von cGMP und cAMP zuständig sind, indirekt beeinflussen kann (Lincoln und Cornwell, 1993) (**Bild 1.8**). cAMP-abhängige Proteinkinasen wurden in der Leber nachgewiesen (Kosmopoulou *et al.*, 1994). Außerdem konnte gezeigt werden, dass ANP über eine Aktivierung der PKA vor Apoptose in der Leber schützt (Gerwig, 2002).

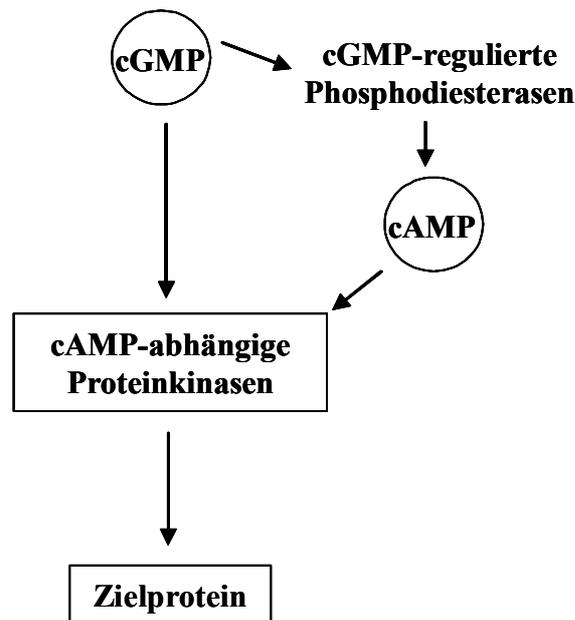


Bild 1.8: Möglichkeiten der cGMP-abhängigen Signaltransduktion in der Leber
(Beschreibung siehe Text)

1.4 HÄMOXYGENASE-1

1.4.1 BIOLOGISCHE FUNKTION

Hämoxygenase (HO), ein Enzym, das 1968 von Tenhunen *et al.* entdeckt wurde, katalysiert den initialen und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des oxidativen Abbaus von Häm (Tenhunen *et al.*, 1968). Es baut Protohäm-IX, welches hauptsächlich aus dem Hämoglobin alternder Erythrozyten stammt, durch Spaltung der α -Methen-Brücke ab. Dabei entstehen gleiche Mengen an Biliverdin-IX α , zweiwertigem Eisen und Kohlenmonoxid (CO). Biliverdin wird in den meisten Säugetierzellen anschließend durch die Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin reduziert (Ryter und Tyrrell, 2000).

Bisher wurden drei Isoformen der HO identifiziert, die alle von unterschiedlichen Genen kodiert werden, HO-1, HO-2 und HO-3. HO-1, die induzierbare Isoform mit einem Molekulargewicht von 32 kDa, kommt in verschiedenen Geweben vor, vor allem aber in der Milz und in der Leber (Maines, 1997). Das Enzym wird außer durch sein Substrat, Protohäm-IX, durch eine Vielzahl von anderen Faktoren, wie z.B. Schwermetalle, ROS, Zytokine, Hormone und auch Hitzeschock stimuliert, weshalb HO-1 auch als heat shock

protein HSP-32 bezeichnet wird. HO-2 wird als 36 kDa Protein konstitutiv exprimiert und wurde hauptsächlich im Gehirn und in den Hoden nachgewiesen. HO-3 hat eine Größe von 33 kDa, wird ebenfalls konstitutiv exprimiert, zeigt aber nur eine geringe enzymatische Aktivität und spielt wahrscheinlich als Sensor für die Häm Spiegel und auch als hämbindendes Protein eine Rolle (McCoubey *et al.*, 1997).

1.4.2 BEDEUTUNG BEIM ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADEN

Zahlreiche Untersuchungen weisen darauf hin, dass eine Induktion der Hämoxigenase-1 zum Schutz vor IRS in der Leber beitragen kann. Amersi und seine Kollegen konnten z.B. durch eine Hochregulation der HO-1 die Fettlebern von Zucker-Ratten vor den Schäden nach Ischämie und Reperfusion schützen (Amersi *et al.*, 1999). Außerdem wirkt die Präkonditionierung von Rattenlebern mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin durch Induktion der HO-1 protektiv (Ito *et al.*, 2000). Auch bei der hyperthermen Präkonditionierung, bei der die Körpertemperatur für eine kurze Zeitdauer auf Temperaturen von ca. 42°C angehoben wird und die den auftretenden Schaden vermindern kann, wird eine Beteiligung der HO-1 diskutiert (Terajima *et al.*, 2000). Die protektive Wirkung der HO-1 Induktion scheint einerseits durch eine Reduktion der Hämkonzentration, andererseits durch dessen Abbauprodukte vermittelt zu werden: Die beiden Reaktionsprodukte Biliverdin und das daraus entstehende Bilirubin sind starke Antioxidantien und könnten so die Zellen vor oxidativem Stress schützen (Stocker *et al.*, 1987; Clark *et al.*, 2000). CO könnte ebenfalls an der Schutzwirkung beteiligt sein, da es über cGMP zur Aufrechterhaltung des Blutflusses in den Gefäßen beiträgt. In der Leber konnte gezeigt werden, dass es die hepatische Mikrozirkulation, die unter Stressbedingungen verschlechtert ist, verbessern kann (Suematsu und Ishimura, 2000). Das beim Abbau des Häm freiwerdende zweiwertige Eisen hat an sich eher prooxidative Eigenschaften, da es über die Fenton Reaktion an der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt ist. Andererseits könnte es die Bildung von Ferritin, einem Eisenspeicherprotein, dem zytoprotektive Eigenschaften zugeschrieben werden (siehe 1.5.1), induzieren. Zwei Arbeiten von Vile *et al.* weisen darauf hin: Eine Behandlung mit HO-1 Antisense Oligonukleotiden inhibierte die Induktion von HO-1 und Ferritin in Fibroblasten und hob so den protektiven Effekt einer kurzzeitigen UVA Bestrahlung der Zellen auf. Eine solche Bestrahlung macht die Zellen im Sinne einer Präkonditionierung weniger empfindlich gegenüber einer späteren längeren Bestrahlung mit UVA. Außerdem konnte die Gabe von

Desferrioxamin, einem Eisenchelator, die Induktion von Ferritin aufheben, nicht jedoch die HO-1 Induktion (Vile *et al.*, 1993 und 1994).

1.5 FERRITIN UND EISENREGULIERENDE PROTEINE

1.5.1 FERRITIN

1.5.1.1 Aufbau und biologische Funktion

Ferritin ist ein weit verbreitetes, zwischen den einzelnen Spezies hoch konserviertes Protein, dessen Hauptaufgabe die Speicherung von Eisen ist. Das überwiegend im Zytosol vorkommende Ferritin setzt sich aus 24 Untereinheiten zusammen und besitzt, wenn es kein Eisen gebunden hat (man bezeichnet es dann auch als Apoferritin), ein Molekulargewicht von etwa 450 kDa. Innerhalb der Untereinheiten unterscheidet man zwei Arten, die H- (heavy, 21,2 kDa, bestehend aus 182 AS) und die L-Untereinheit (light, 19,7 kDa, bestehend aus 174 AS), die von verschiedenen Genen kodiert werden (Caskey *et al.*, 1983; Worwood *et al.*, 1985). Das Verhältnis der beiden Untereinheiten in Ferritin kann abhängig vom Gewebetyp und vom physiologischen Status der Zelle sehr stark variieren, in der Leber und in der Milz überwiegt z.B. eher die L-Untereinheit, während im Herzen und in der Niere die H-Untereinheit vorherrschend ist (Arosio *et al.*, 1976). Das Verhältnis von H- zu L-Ferritin ist jedoch nicht immer konstant, sondern kann sich z.B. bei Entzündungen, Infektionen oder auch im Verlauf von Differenzierungs- und Entwicklungsprozessen der Zelle ändern. Ferritin besitzt neben seiner Funktion als Eisenspeicherprotein auch enzymatische Eigenschaften, da es in der Lage ist, Fe(II) zu Fe(III) zu oxidieren. Dies geschieht durch die H-Untereinheit, die Ferroxidase Aktivität besitzt (Lawson *et al.*, 1989).

Ferritin werden aufgrund seiner Fähigkeit, Eisen zu binden und zu speichern, zytoprotektive Eigenschaften zugeschrieben (Kakhlon *et al.*, 2001; Picard *et al.*, 1996 und 1998; Konijn *et al.*, 1999). Eisen ist zwar einerseits für den Körper sehr wichtig, da es z.B. als Kofaktor vieler Enzyme fungiert und somit an Vorgängen wie der Bindung, des Transports und der Abgabe von Sauerstoff (Hämoglobin), dem Sauerstoffmetabolismus an sich (Oxidasen, Peroxidasen) oder auch beim Elektronentransfer (Cytochrome) beteiligt ist, andererseits kann Eisen über die Fenton Reaktion ($\text{Fe(II)} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe(III)} + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$) die Bildung von Hydroxylradikalen katalysieren und somit zum oxidativen Stress erheblich beitragen (Halliwell und Gutteridge, 1989). ROS können z.B. durch verstärkte Lipidperoxidation, durch

DNA-Strangbrüche und Basenmodifikationen und auch durch Oxidation zahlreicher Proteine der Zelle schaden. Ein einzelnes Molekül Apoferritin kann bis zu 4500 Eisenatome aufnehmen (Ponka, 1999). Die Aufnahme von Eisen erfolgt wahrscheinlich über bestimmte Kanäle in der Proteinhülle. Zweiwertiges Eisen wird schneller aufgenommen als dreiwertiges und wird im Inneren des Proteins zu Fe(III) oxidiert und als Phosphat gefällt. Es ist sehr wenig darüber bekannt, wie Eisen aus Ferritin freigesetzt werden kann, wahrscheinlich spielt der Abbau von Ferritin eine entscheidende Rolle bei der Bereitstellung von Eisen für die Zelle (Pippard, 1986). Möglich ist auch eine Beteiligung von reduzierend wirkenden Substanzen, wie z.B. Cystein, Glutathion oder Ascorbinsäure (Bonkovsky, 1991).

1.5.1.2 Regulation der Ferritinexpression

Die Ferritinexpression wird hauptsächlich posttranskriptionell reguliert (Zahringer *et al.*, 1976) (**Bild 1.9**). Dies geschieht vor allem durch Reaktion zweier RNA-bindender Proteine (Iron Regulatory Proteins, IRPs, siehe auch 1.5.2) mit einem regulatorischen Element in der 5'-nichttranslatierten Region (5'-UTR) der Ferritin mRNA, das als Iron Responsive Element (IRE) bezeichnet wird. Das IRE besteht aus 30 Nukleotiden (nt) und hat eine schlaufenähnliche Struktur. Innerhalb der Sequenz gibt es eine stark konservierte Region (CAGUGN). Das IRE in der Ferritin mRNA weist 5 bp vom 5'-Ende der IRE-Sequenz zusätzlich eine kleine Auswölbung auf, die ein ungepaartes Cystein enthält und die zu einer effektiven Bindung der IRPs wichtig ist. Bei niedrigen Eisenspiegeln in der Zelle binden die IRPs an das IRE und verhindern die mRNA-Translation, indem sie die Interaktion des 43S Translationskomplexes mit der mRNA verhindern. Bei erhöhten Eisenspiegeln ist die Bindungsaktivität der IRPs herabgesetzt und die Translation kann erfolgen. (Hentze und Kühn, 1996).

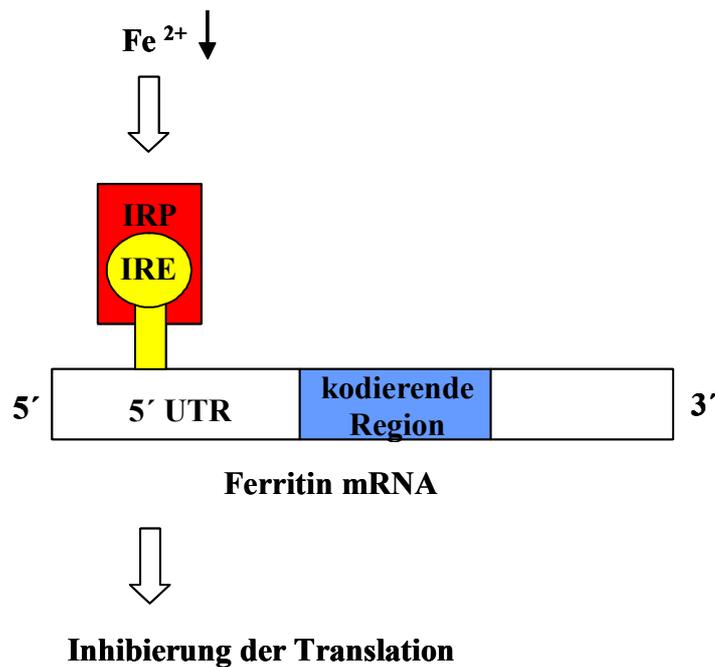


Bild 1.9: Postranskriptionelle Regulation von Ferritin

Neben Ferritin besitzen auch noch andere an der Eisenhomöostase beteiligte Proteine solche IREs in ihrer mRNA, wie z.B. die 5-Aminolävulinatsynthase (eALAS), die an der Hämbiosynthese beteiligt ist, oder der Transferrinrezeptor, der Transferrin, ein Eisentransportprotein, bindet und für die Aufnahme von Eisen in die Zelle verantwortlich ist. (Cairo und Pietrangelo, 2000). Die IREs können sich jedoch in Anzahl, Lokalisation, Struktur und auch in ihrer Funktion stark unterscheiden. So findet man z.B. in der mRNA des Transferrinrezeptors fünf IREs in der 3'UTR. Bindung der IRPs bei niedrigen Eisenspiegeln führt zu einer Erhöhung der mRNA-Stabilität, was eine vermehrte Expression des Rezeptors und somit eine verstärkte Aufnahme von Eisen in die Zelle zur Folge hat.

Eine Regulation der Ferritinexpression kann aber auch auf transkriptioneller Ebene erfolgen: So können die beiden proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\alpha$ die Synthese der H-Untereinheit der Ferritin mRNA in mesenchymalen Zellen induzieren (Torti *et al.*, 1988; Wei *et al.*, 1990). Ähnliches wurde auch für einige Hormone, Wachstumsfaktoren und second messengers beschrieben: Thyrotropin verstärkt die Bildung der H-Untereinheit in Schilddrüsenzellen der Ratte (Coluccidamato *et al.*, 1989). Dieser Effekt wird wahrscheinlich über cAMP vermittelt. Eine cAMP-medierte Induktion der Ferritin-H-Transkription wurde auch in humanen HeLa-Zellen beobachtet (Bevilacqua *et al.*, 1994). Desweiteren induzieren

Insulin und IGF-1 (insulin growth factor-1) die mRNA beider Ferritin-Untereinheiten in C6 Gliomzellen (Yokomori *et al.*, 1991).

1.5.2 EISENREGULIERENDE PROTEINE

1.5.2.1 Überblick

Bisher sind zwei im Zytosol vorkommende, Eisenregulierende Proteine bekannt, die an die IRE-Sequenz binden und so die Ferritin mRNA-Translation beeinflussen können, IRP-1 und IRP-2.

IRP-1 besteht aus 889 AS und hat eine molekulare Masse von etwa 98 kDa. Es kann in zwei verschiedenen Formen vorkommen, zum einen als IRE-bindendes Protein, zum anderen als zytosolische Aconitase mit einem sog. Eisen-Schwefel (4Fe-4S) Cluster, das von mehreren Cysteinresten (Cys437, Cys503, Cys506) koordiniert wird (**Bild 1.10**). Als zytosolische Aconitase weist IRP-1 eine hohe Homologie zur mitochondrialen Aconitase auf, einem Enzym des Citratzyklus, das die Umwandlung von Citrat zu Isocitrat katalysiert. Der Cluster ist eine prosthetische Gruppe, die den Elektronentransport erleichtern kann und Bestandteil einiger Enzyme der Atmungskette ist. Sind die Eisenspiegel der Zelle erhöht, liegt IRP-1 überwiegend als Aconitase vor, bei erniedrigten Eisenspiegeln hat es vorwiegend IRE-bindende Eigenschaften. Es sind aber auch andere Formen von IRP-1 beschrieben worden, z.B. eine (3Fe-4S)-Zwischenstufe und eine oxidierte Apoproteinform (apo-IRP-1) ohne Cluster, aber auch ohne IRE-Bindungsaktivität (Cairo und Pietrangelo, 2000). Die genaue Struktur von IRP-1 ist noch nicht bekannt. Da IRP-1 aber eine hohe Homologie zur mitochondrialen Aconitase aufweist, besteht es wahrscheinlich aus vier verschiedenen Domänen, wobei sich zwischen den Domänen 1-3 und 4 eine Spalte befindet, innerhalb der die Bindung an das IRE stattfindet. Dabei scheint die Bindung an das IRE durch IRP-1 nicht auf eine kleine Region beschränkt zu sein, sondern mehrere Bereiche des Proteins zu betreffen (AS 116-151, AS 480-623 und C-terminale Region) (Thomson *et al.*, 1999). Bei der Aconitase-Form von IRP-1 ist diese Spalte wegen des Eisen-Schwefel-Clusters nicht zugänglich (Hentze und Kühn, 1996). Welche Funktion IRP-1 als zytosolische Aconitase ausübt, ist noch nicht aufgeklärt worden. Eine Möglichkeit wäre, dass durch die gesteigerte Umsetzung von Citrat die NADPH-Level und somit die Redoxäquivalente der Zelle ansteigen, welche die Zellen unempfindlicher gegen Eisen-medierten oxidativen Stress machen (Narahari *et al.*, 2000).

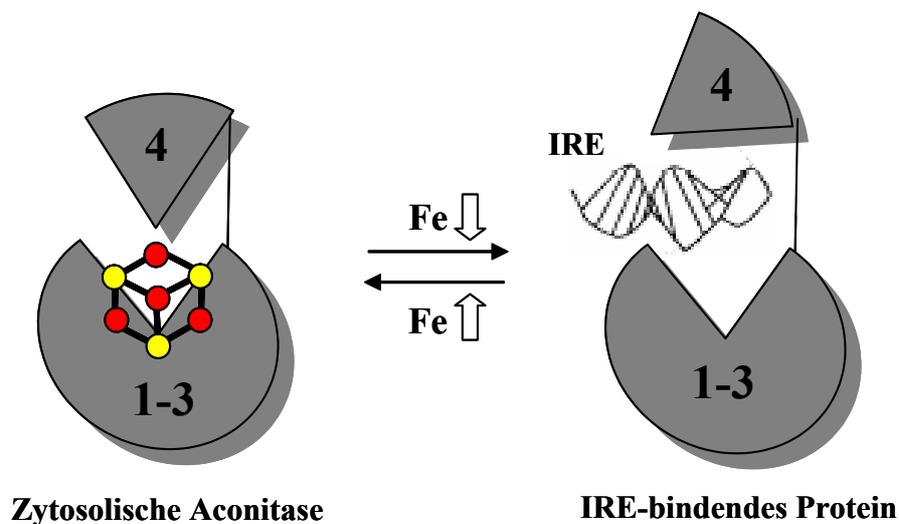


Bild 1.10: Verschiedene Funktionen von IRP-1

IRP-2 (105 kDa) ist stark homolog zu IRP-1, allerdings ist am N-Terminus eine 73 AS lange Sequenz eingebaut, die beim Abbau von IRP-2 eine wichtige Rolle spielt. Außerdem zeigt IRP-2 im Gegensatz zu IRP-1 keine Aconitase-Aktivität und besitzt auch keinen Eisen-Schwefel-Cluster. Somit wird es bei erhöhten Eisenspiegeln auch nicht enzymatisch aktiv, sondern wird vermehrt im Proteasom abgebaut (Hentze und Kühn, 1996).

Welche spezifischen Aufgaben IRP-2 im Vergleich zu IRP-1 haben könnte, ist noch nicht genau bekannt. Doch weisen einerseits die unterschiedliche Gewebeexpression und andererseits die unterschiedliche Regulation durch andere Faktoren als Eisen (siehe 1.5.2.2) auf eine spezifische Rolle von IRP-2 bei der Eisenhomöostase hin (Hentze und Kühn, 1996). IRP-1 wird beispielsweise überwiegend in der Leber, der Niere, im Darm und im Gehirn exprimiert, während IRP-2 z.B. in der Schilddrüse überwiegt (Thomson *et al.*, 1999).

1.5.2.2 Regulation der RNA-Bindungsaktivität

Die intrazellulären Eisenspiegel haben bei der Regulation der IRP-Bindungsaktivität eine wichtige und zentrale Rolle, doch es gibt auch noch eine Reihe weiterer Faktoren, die die Bindung der IRPs an IREs beeinflussen. Dazu gehören u.a. NO, oxidativer Stress durch H_2O_2 und Hypoxie. Allerdings finden sich in der Literatur hierzu sehr unterschiedliche und z.T. auch widersprüchliche Effekte auf IRP-1 und IRP-2. Eine weitere Möglichkeit der Regulation, die diskutiert wird, ist die Phosphorylierung von IRP-1 durch PKC. Eine Aktivierung der PKC mit Phorbolestern führt in HL60-Zellen zu einer verstärkten RNA-

Bindungsaktivität von IRP-1 und IRP-2 (Schalinske und Eisenstein, 1996). Wahrscheinlich wird IRP-1 durch PKC an Ser138 phosphoryliert, was die Clusterbildung beeinträchtigen und so zur Aktivierung führen könnte.

1.6 GLYCERALDEHYD-3-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE (GAPDH)

1.6.1 BIOLOGISCHE FUNKTION

Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ist ein zytosolisches, weit verbreitetes Enzym und spielt eine Schlüsselrolle bei der Glykolyse. Es katalysiert die Umwandlung von Glyceraldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Biphosphoglycerat.

GAPDH existiert als Tetramer aus vier gleichen Untereinheiten, die aus jeweils 335 AS bestehen. Der N-Terminus ist für die Bindung von NAD^+ wichtig, der C-Terminus spielt bei der Bindung des Substrats eine wichtige Rolle.

Da GAPDH sehr lange als sog. Housekeeping Gene betrachtet wurde, dessen Expression als wenig reguliert gilt, wurde und wird es sehr oft als interner Standard bei der Quantifizierung von mRNA verwendet. In den letzten Jahren gab es jedoch einige Untersuchungen, die darauf hinweisen, dass die Expression von GAPDH unter bestimmten Umständen durch eine Reihe von Faktoren reguliert wird und dass es neben seiner Funktion bei der Energiegewinnung auch noch an anderen Prozessen in Säugetierzellen beteiligt ist. Außerdem scheint es außer im Zytosol auch noch in anderen Kompartimenten der Zelle lokalisiert zu sein, wie z.B. in der Plasmamembran, in den Mitochondrien und auch im Zellkern (Sirover, 1999).

1.6.2 NEUE FUNKTIONEN VON GAPDH IN SÄUGETIERZELLEN

Als mögliche neue Funktionen von GAPDH in Säugetierzellen wurde u.a. eine Beteiligung an der Fusion von Membranen, an der Endozytose und an einer Modulierung der Zytoskelettstruktur durch Inhibierung der Tubulinpolymerisation beschrieben. Außerdem soll GAPDH Phosphotransferase und -kinase Aktivität besitzen, spezifisch an Makromoleküle binden und auch als Transkriptionsaktivator und Uracil-DNA-Glykosylase fungieren können (Sirover, 1999). Bei neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. Morbus Alzheimer oder Chorea Huntington und auch bei der Auslösung von Apoptose scheint GAPDH ebenfalls eine Rolle zu spielen (Sirover, 1999). Oxidativer Stress und Ischämie können die Expression von GAPDH beeinflussen: So sind die GAPDH mRNA-Level nach oxidativem Stress in isolierten

Aorten aus dem Hasen (Ito *et al.*, 1996) und im Myokard von Schweinen nach Ischämie stark erhöht (Liedtke und Lynch, 1999).

Bei allen neu beschriebenen Funktionen scheint GAPDH keine oder nur eine sehr geringe glykolytische Aktivität zu besitzen (Sirover, 1999). Besonders interessant ist die Beteiligung von GAPDH an der Auslösung von Apoptose. Man nimmt an, dass es zur erhöhten Expression und zu einer Translokation von GAPDH in den Zellkern kommt. Durch Vorinkubation mit Antisense Oligonukleotiden gegen GAPDH kann die Auslösung der Apoptose verhindert werden (Ishitani *et al.*, 1996a und 1996b, Ishitani und Chuang, 1996, Saunders *et al.*, 1999; Carlile *et al.*, 2000). Diese Effekte wurden vor allem in neuronalen Zellen beobachtet, aber es gibt auch Arbeiten, die dies an nicht-neuronalen Zellen zeigen (Sawa *et al.*, 1997). Eine weitere sehr interessante Beobachtung wurde von Kragten *et al.* gemacht: Diese Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass CGP3466, eine mit dem Parkinsonmedikament Selegilin (Deprenyl[®]) strukturell verwandte Substanz, an GAPDH bindet (Kragten *et al.*, 1998). CP3466 und R-Deprenyl haben beide antiapoptotische Eigenschaften.

Welche Faktoren eine vermehrte Expression und Translokation von GAPDH verursachen können, wurde noch nicht aufgeklärt. Chen *et al.* konnten in neuronalen Zellen einen Zusammenhang zwischen dem Tumorsuppressorgen p53 und GAPDH herstellen und diskutieren, dass eine verstärkte Expression von GAPDH durch p53 vermittelt wird (Chen *et al.*, 1999). Wie GAPDH Apoptose auslösen kann, ist ebenfalls noch nicht bekannt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass GAPDH, anders als ursprünglich angenommen, nicht nur als Schlüsselenzym der Glykolyse eine wichtige Rolle spielt, sondern auch noch in ganz andere Signaltransduktionswege und Pathomechanismen involviert zu sein scheint. Da GAPDH in all diesen neuen Funktionen fast keine Dehydrogenase-Aktivität zeigt, gibt es unter Umständen spezifische Isoformen von GAPDH, die diese neue Funktion ausüben (Saunders *et al.*, 1999). Wahrscheinlich wird die Expression von GAPDH auch in weitaus größerem Maße reguliert als bisher vermutet.

Wie bereits unter 1.1 erwähnt, beobachteten wir in einem RT-PCR Experiment in den mit ANP präkonditionierten Lebern eine Reduktion der GAPDH mRNA-Expression nach kalter Ischämie und während der Reperfusion. Dies war im Hinblick auf die oben dargestellten neuen Funktionen für GAPDH eine sehr interessante Beobachtung, die im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden sollte. Zur genauen Quantifizierung der GAPDH mRNA-

Expression wurde eine relativ neue Methode der quantitativen PCR eingesetzt, die Real-Time PCR. Die Grundlagen dieser Methode werden im folgenden Kapitel kurz dargestellt.

1.7 QUANTIFIZIERUNG VON MRNA MITTELS REAL-TIME PCR

Die Real-Time PCR ist eine Methode zur genauen Quantifizierung von mRNA-Mengen (Reviews: Ginzinger, 2002; Bustin, 2000 und 2002; Giulietti, 2001).

Vom Grundprinzip her läuft sie genauso ab wie eine herkömmliche PCR: Aus einer einzelsträngigen cDNA wird ausgehend von einem Startermolekül durch eine DNA-Polymerase ein neuer DNA-Strang synthetisiert. Als Startermoleküle werden synthetische DNA-Oligonukleotide (Primer) verwendet, die an die Matrizen-DNA hybridisieren. Von deren 3'-Ende aus synthetisiert die DNA-Polymerase den neuen DNA-Doppelstrang. Durch die Wahl eines gegenläufig orientierten Primerpaares kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern vervielfältigt werden. Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, wobei die DNA exponentiell amplifiziert wird. Bei der normalen RT-PCR werden nach Abschluss der PCR die entstandenen Produkte auf einem Agarosegel aufgetrennt, identifiziert und semiquantitativ bestimmt. Man bezeichnet dies auch als Endpunktsbestimmung, da die Menge an entstandenem Produkt erst **nach** abgeschlossener PCR-Reaktion bestimmt wird.

Das Besondere der Real-Time PCR ist, dass **während** der PCR-Reaktion permanent die Menge an entstandenem Produkt gemessen und aufgezeichnet wird. Bei einer späteren Auswertung können Expressionsunterschiede der zu untersuchenden Gene zwischen zwei Proben im exponentiellen Bereich der PCR-Reaktion bestimmt werden.

Bei der Durchführung der Real-Time PCR wird dem Reaktionsansatz neben den üblichen Komponenten zusätzlich ein Farbstoff (SYBR[®] Green) zugesetzt, der sich an doppelsträngige DNA anlagern kann. Sobald dieser Farbstoff an doppelsträngige DNA bindet, fluoresziert er. Veränderungen der Fluoreszenz werden während der ablaufenden Reaktion ständig gemessen und aufgezeichnet. Die SYBR[®] Green-Methode ist relativ billig, aber ein großer Nachteil besteht darin, dass jegliche Art von doppelsträngiger DNA erfasst wird, also auch unspezifische Produkte wie z.B. Primer-Dimere.

Eine teurere, aber etwas spezifischere Methode ist der Einsatz von sog. Hybridization Probes (**Bild 1.11**). Dies sind max. 30 bp lange Oligonukleotidsequenzen, die an die zu amplifizierende cDNA spezifisch binden. Am 5'-Ende sitzt ein fluoreszierender Reporterfarbstoff (R), z.B. 6-Carboxy-Fluorescein, dessen Fluoreszenz jedoch durch einen

entsprechenden Quencherfarbstoff (Q) am 3'-Ende, z.B. 6-Carboxytetramethylrhodamin, unterdrückt wird. Diese Sonde hybridisiert während der PCR-Reaktion spezifisch an die cDNA. Sie wird jedoch im weiteren Verlauf von dem sich neu bildenden Strang verdrängt. Bevor dieser Verdrängungsvorgang vollständig abgeschlossen ist, wird die Sonde jedoch von der Taq DNA-Polymerase durch deren 5'-3'-Exonuklease-Aktivität zwischen dem Reporter- und dem Quencherfarbstoff gespalten. Dies resultiert in einer verstärkten Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes, da er nun frei in der Lösung vorliegt und räumlich vom Quencherfarbstoff getrennt ist. Der Anstieg der Fluoreszenz ist direkt proportional zur Menge an entstandenem Produkt, da die Taq DNA-Polymerase nur Sonden spaltet, die spezifisch an das Template gebunden sind und nicht die, die frei in der Lösung vorliegen.

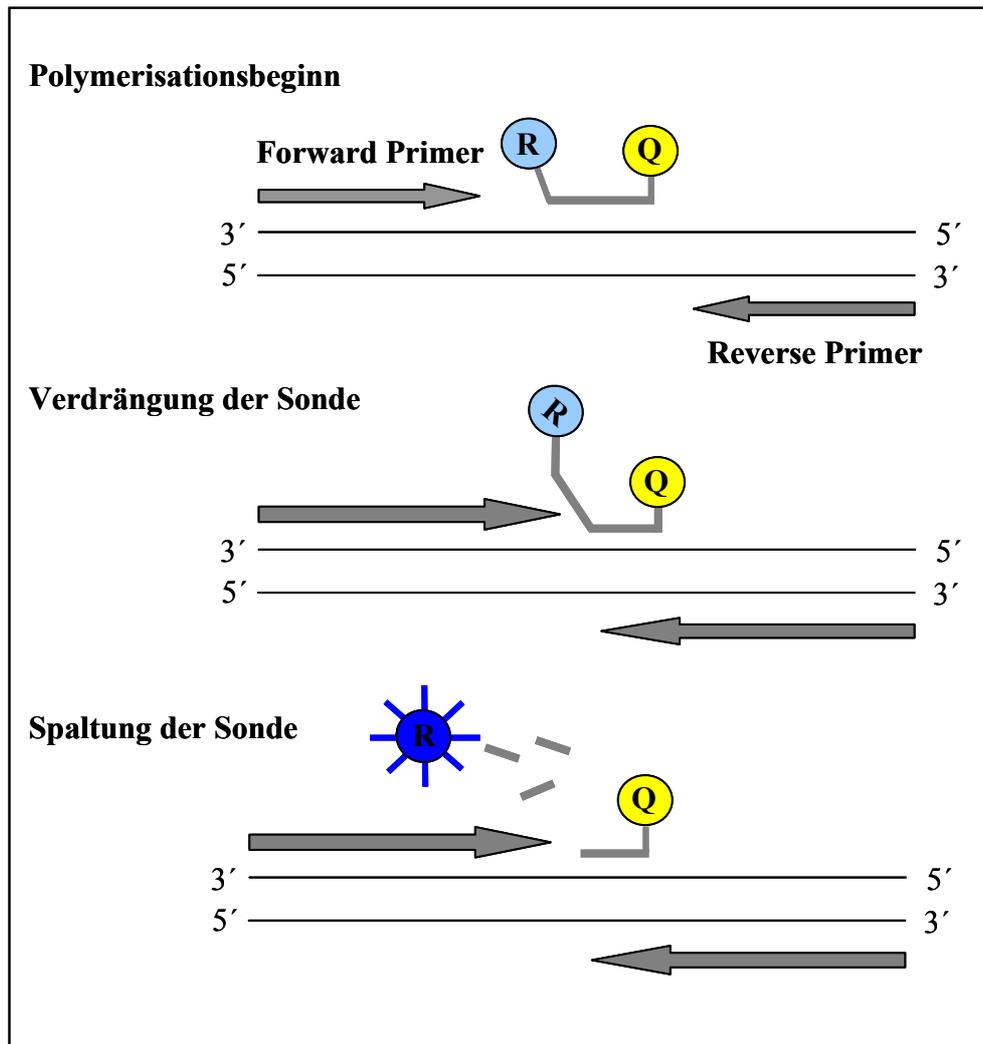


Bild 1.11: Prinzip der Real-Time PCR
(nach PE Applied Biosystems; Beschreibung siehe Text)

Quantitative Auswertung (Bild 1.12)

Nach beendeter PCR-Reaktion setzt man einen Schwellenwert für die Fluoreszenz fest und bestimmt für jede Probe die Anzahl der Zyklen, bei der dieser Schwellenwert erreicht ist. Diese Werte bezeichnet man auch als C_T -Werte (cycle threshold). Eine Probe mit einem höheren C_T -Wert hatte eine niedrigere Ausgangskonzentration an zu amplifizierender cDNA, da mehr Zyklen benötigt wurden, um den Fluoreszenzschwellenwert zu erreichen. Eine Probe mit einem niedrigeren C_T -Wert entsprechend eine höhere. Zur quantitativen Auswertung und zum Vergleich zweier Proben wird die Differenz der C_T -Werte gebildet (ΔC_T -Wert). Da in jedem PCR-Zyklus eine Verdopplung stattfindet, beträgt der Unterschied zwischen zwei Proben $2^{\Delta C_T}$.

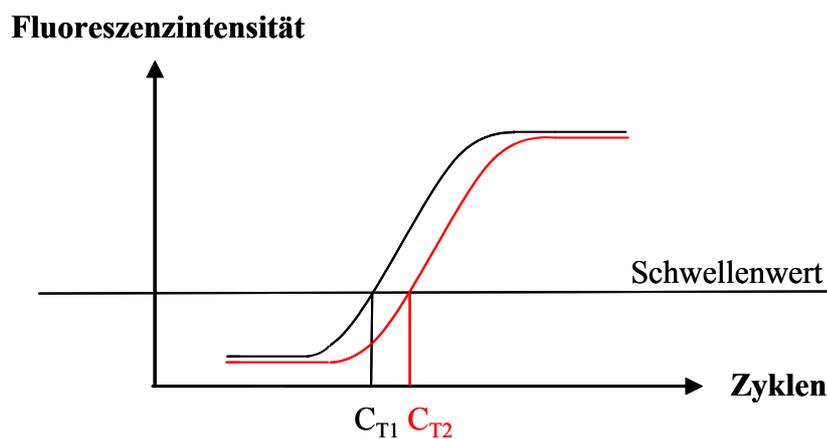


Bild 1.12: Quantifizierung der Real-Time PCR
(Beschreibung siehe Text)

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 DIE ISOLIERT PERFUNDIERTE RATTENLEBER

2.1.1 TIERE

Männliche Sprague-Dawley Ratten wurden von der Charles River Wiga GmbH (Sulzfeld) bezogen. Für die isolierte Perfusion wurden Ratten mit einem Gewicht von 200-300 g verwendet, die in einem temperatur- und feuchtigkeitsregulierten Raum mit einem konstanten 12 h Licht-Dunkel-Zyklus gehalten wurden. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und Futter (Ssniff-Diät, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest). Die Haltung der Tiere wurde vom Städtischen Veterinäramt München überwacht.

2.1.2 LÖSUNGEN

Krebs-Henseleit Puffer (KH-Puffer) pH 7,4

NaCl	118 mM
KCl	4,8 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2 mM
NaHCO ₃	25 mM
CaCl ₂	1,5 mM

2.1.3 DURCHFÜHRUNG

Die isolierten Leberperfusionsen für das Modell der kalten Ischämie und Reperfusion wurden von Herrn Dr. T. Gerwig, Department Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München (Gerwig, 2002) durchgeführt.

Die isolierten Leberperfusionsen für das Modell der warmen Ischämie und Reperfusion nahm Herr Dr. C. Müller, Department Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München (Müller, 2002) vor.

Für beide Modelle wurden die Tiere zunächst mit Narcoren[®] (Merial, Hallbergmoos, 50 mg/kg Körpergewicht, intraperitoneal) anästhesiert. Anschließend wurde nach Öffnen des Bauchraums und Freilegung der Leber die Portalvene kanüliert und die Leber mit einer hämoglobin- und albuminfreien, bicarbonat-gepufferten KH-Lösung pH 7,4 (37°C, begast mit

95% O₂ und 5% CO₂, Linde, Unterschleißheim) nicht-rezirkulierend 30 min lang perfundiert. Der Abfluss des Perfusats erfolgte über die untere Hohlvene.

2.1.3.1 Kalte Ischämie und Reperfusion

Das Modell der kalten Ischämie und Reperfusion wurde im Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München etabliert (Gerbes *et al.*, 1998).

Nach 30 min Perfusion wurden die Lebern 1 min mit 30 ml kalter (4°C) University of Wisconsin (UW) Lösung (Viaspan[®], DuPont Pharma GmbH, Bad Homburg) durchspült. Die Organe wurden anschließend 24 h in 100 ml UW-Lösung bei 4°C gelagert. Nach dieser Ischämiephase wurden die Lebern mit KH-Puffer 2 h lang reperfundiert. Die ersten Milliliter an Eluat, die nach der Ischämie aus der Leber ausgespült wurden, wurden für den Nachweis von Matrix Metalloproteinasen (siehe 2.12) gesammelt.

Die Organe wurden mit unterschiedlichen Substanzen, die dem KH-Puffer von der 10.-30. Minute der Perfusion und z.T. auch der Konservierungslösung zugesetzt wurden, vorbehandelt (siehe 2.1.3.3).

Zu gegebenen Zeitpunkten (nach 30 min Anperfusion, am Ende der Ischämie und nach 45 und 120 min Reperfusion) wurden die Lebern in flüssigem Stickstoff schockgefroren (**Bild 2.1**) und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert (Herafreeze, Heraeus, Hanau). Wenn nicht anders angegeben, wurden 4-5 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

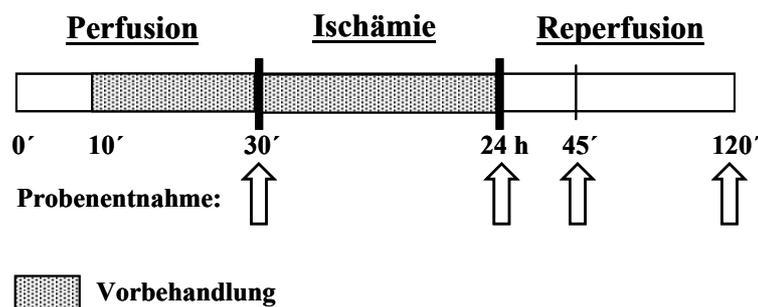


Bild 2.1: Experimentelle Durchführung der kalten Ischämie und Reperfusion

2.1.3.2 Warme Ischämie und Reperfusion

Die Durchführung der warmen Ischämie und Reperfusion erfolgte nach Bilzer *et al.*, 1994.

Nach 30 min Perfusion wurden die Lebern 1 h bei 37°C gelagert. Dieser Phase der warmen Ischämie folgten 90 min Reperfusion mit KH-Puffer. Die Lebern wurden mit α -Liponsäure, die dem KH-Puffer von der 10.-30. Minute der Perfusion zugesetzt wurde, vorbehandelt (siehe 2.1.3.3).

Zu gegebenen Zeitpunkten (nach 30 min Perfusion, 60 min warmer Ischämie, 45 und 90 min Reperfusion) wurden die Lebern wie unter 2.1.3.1 beschrieben mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert (**Bild 2.2**). Wenn nicht anders angegeben, wurden 4-5 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

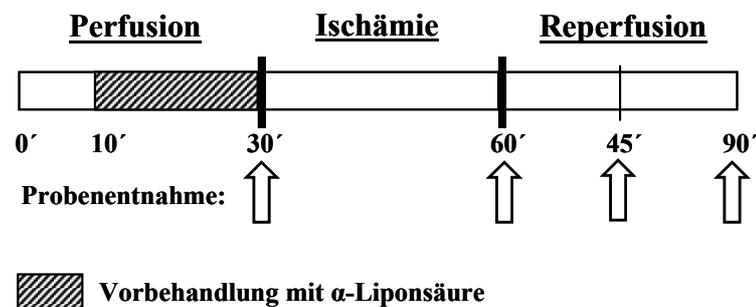


Bild 2.2: Experimentelle Durchführung der warmen Ischämie und Reperfusion

2.1.3.3 Vorbehandlung der Organe

Kalte Ischämie und Reperfusion

Zur Vorbehandlung der Organe wurden ANP, 8-Br-cGMP und der Hämoxxygenase-1 (HO-1) Inhibitor Zinnprotoporphyrin (SnPP) in einem entsprechenden Lösungsmittel aufgelöst und über Perfusor[®] Spritzen (Braun Melsungen AG, Melsungen) von der 10.-30. Minute der Perfusion in den in **Tabelle 2.1** angegebenen Konzentrationen dem KH-Puffer zugesetzt. ANP und 8-Br-cGMP wurden in der gleichen Konzentration auch der Konservierungslösung für die Ischämie zugesetzt.

Tabelle 2.1: Substanzen zur Vorbehandlung der Rattenlebern

Substanzen	Firma	Endkonzentration	Lösungsmittel
ratANP 99-126	Calbiochem	200 nM	0,9% (m/V) NaCl
8-Br-cGMP	Sigma	50 μ M	H ₂ O
SnPP	Alexis Biochemicals	1 μ M	2,4 mg SnPP in 5 ml 0,1 N NaOH + 5 ml KH- Puffer pH 7,4

Warme Ischämie und Reperfusion

Zur Vorbehandlung der Organe wurde racemische α -Liponsäure (ASTA Medica, Frankfurt/Main) in KH-Puffer aufgelöst und wie beim Modell der kalten Ischämie und Reperfusion von der 10.-30. Minute der Perfusionslösung zugesetzt (Endkonzentration: 50 μ M).

2.1.3.4 Depletion der Kupfferzellen

Um Aussagen über die zelluläre Lokalisation einiger Effekte von ANP machen zu können, wurden zum einen Versuche an isolierten Rattenhepatozyten (siehe 2.3) durchgeführt, zum anderen wurden die Kupfferzellen, die Makrophagen der Leber, in den Tieren depletiert und die Lebern anschließend in An- und Abwesenheit von ANP (200 nM) wie unter 2.1.3.1 beschrieben 30 min mit KH-Puffer perfundiert. Die Organe wurden für die weiteren Versuche verwendet, um eine Beteiligung von Kupfferzellen an den ANP-Effekten zu untersuchen.

Die Depletion der Kupfferzellen wurde von Herrn Dr. T. Gerwig und Frau S. Kulhanek-Heinze, Department Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Die angewendete Methode beruht auf einer durch Clodronat-haltige Liposomen mediierten Depletion von Makrophagen (Van Rooijen und Sanders, 1994). Clodronat (Cl₂MBP, Roche Diagnostics, Mannheim) ist ein anionisches Biphosphonat, welches in den Zellen Apoptose auslösen kann. Der Mechanismus beruht wahrscheinlich auf einer Depletion von intrazellulärem Eisen (Van Rooijen, 1993; Mönkkönen und Heath, 1993) oder einem direkten Eingriff in den ATP-Metabolismus (Van Rooijen, 1993). Um Clodronat gezielt in Kupfferzellen anreichern zu können, wurden den Tieren unter Ether-Narkose Clodronat-haltige Liposomen in die Schwanzvene injiziert. Diese Liposomen bestehen aus mehreren konzentrischen Phospholipidbilayer-Schichten, zwischen denen sich jeweils eine wässrige Phase mit gelöstem Cl₂MBP befindet. Sie wurden von Herrn Nico Van Rooijen (Department für Zellbiologie der Medizinischen Fakultät, Freie Universität Amsterdam, Niederlande)

hergestellt. Nach intravenöser Applikation werden sie von Kupfferzellen phagozytiert. In der Kupfferzelle bauen dann lysosomale Phospholipasen die Phospholipidbilayer-Schichten ab, so dass es zu einer Freisetzung von Cl₂MBP kommt und die Zellen in der Folge apoptotisch sterben. Da Cl₂MBP die Zellmembran nur schwer passieren kann, werden gezielt Kupfferzellen depletiert. 48 h nach der Gabe der Clodronat-haltigen Liposomen wurde die Perfusion (30 min, in An- und Abwesenheit von 200 nM ANP) wie unter 2.1.3.1 beschrieben vorgenommen. In der Kontroll- sowie in der mit ANP präkonditionierten Gruppe wurde je fünf Tieren 900 µl der Liposomen in die Schwanzvene injiziert, 5 Tiere erhielten stattdessen eine Injektion von 900 µl 0,9% (m/V) NaCl.

Das Ausmaß der Depletion wurde immunhistologisch durch Bestimmung der Anzahl ED-2 positiver Zellen mit einem gegen ED-2 der Ratte gerichteten Antikörper (mouse anti-rat CD163, Serotec GmbH, Düsseldorf) von Herrn Dr. H. Meißner (Institut für Pathologie, Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München) untersucht. ED-2 ist ein spezifisches Oberflächenantigen auf adulten Kupfferzellen. Für weitere Versuche wurden nur die Lebern verwendet, bei denen mindestens 80% der Kupfferzellen depletiert waren.

2.2 DAS TIERMODELL FÜR DIE ISCHÄMISCHE PRÄKONDITIONIERUNG

2.2.1 TIERE

Die für die Experimente verwendeten Tiere stammen aus einer Versuchsreihe von Herrn PD Dr. M. Bilzer (Medizinische Klinik II, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München), bei der Unterschiede im Signaltransduktionsweg der Ischämischen Präkonditionierung zwischen Fettlebern und normalen Lebern untersucht werden sollten. Als Modell für Fettlebern wurden homozygote Zucker-Ratten eingesetzt. Diesen Ratten fehlt der zerebrale Leptin-Rezeptor und die Tiere entwickeln daher bis zu einem Alter von 8 Wochen durch vermehrte Nahrungsaufnahme und verringerten Energieverbrauch Fettleibigkeit und eine Fettleber. Heterozygote Zucker-Ratten sind dagegen normalgewichtig und dienen als Kontrolltiere. Für die Versuche zur Regulation von Eisenregulierenden Proteinen und Ferritin wurden 8 Wochen alte, männliche, heterozygote Zucker-Ratten mit einem Gewicht von 240-260 g verwendet. Sie wurden von der Charles River Wiga GmbH (Sulzfeld) bezogen und in einem temperatur- und feuchtigkeitsregulierten Raum mit einem konstanten 12 h Licht-Dunkel-Zyklus mit freiem Zugang zu Wasser und Futter (Ssniff-Diät, Ssniff Spezialdiäten

GmbH, Soest) gehalten. Die Haltung der Tiere wurde vom Städtischen Veterinäramt München überwacht.

2.2.2 DURCHFÜHRUNG

Die Operation der Tiere mit anschließender Ischämischer Präkonditionierung wurde von Herrn T. Prüfer, Chirurgische Klinik und Poliklinik, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München, durchgeführt.

12 h vor dem operativen Eingriff erhielten die Tiere keine Nahrung mehr, sie hatten jedoch noch freien Zugang zu Wasser.

Die Tiere wurden zunächst mit Ether in einem Glas-Ethertopf unter ständiger Kontrolle der Vitalfunktionen narkotisiert und anschließend auf einer Operationsplatte mit integriertem Heizteil in Rückenlage an den Extremitäten fixiert. Die Narkose wurde während der Operation durch eine Atemmaske, die mit einer Ether-getränkten Kompresse bestückt war, aufrechterhalten. Die Körperkerntemperatur wurde durch eine rektal eingeführte Thermosonde, die an das Wärmeaggregat der Heizplatte angeschlossen war, zwischen 36,5°C und 37,5°C gehalten. Nach Rasur des Bauchfells und Desinfektion mit Ethanol 70% (V/V) wurde der Bauchraum geöffnet und die Leber freigelegt. Zur Vermeidung einer portalen Hypertension mit Kongestion im mesenterialen Strombett und nachfolgender systemischer Hypotension wurde das Modell der partiellen Ischämie gewählt (Kawano *et al.*, 1989). Zur Induktion der Ischämie wurden selektiv Äste der Pfortader und der Arterien, die die Segmente II, III, IV, V (mittlerer Leberlappen) und VIII (linker Leberlappen) versorgen, mit mikrovaskulären Gefäßclips reversibel okkludiert.

Für die Ischämische Präkonditionierung wurden die Lebern 10 min von der Sauerstoffversorgung abgetrennt. Die nachfolgende Reperfusion, die durch Entfernung der Gefäßclips eingeleitet wurde, dauerte ebenfalls 10 min. Die Tiere der Kontrollgruppe wurden wie oben beschrieben operiert, allerdings nicht ischämisch präkonditioniert, sondern 20 min auf dem Operationstisch liegen gelassen. Nach der Reperfusionsphase bzw. nach der simulierten Ischämischen Präkonditionierung in der Kontrolle erfolgte eine Resektion des mittleren Leberlappens. Anschließend wurden die Gefäße in beiden Gruppen erneut für 60 min okkludiert. Nach dieser Ischämiephase wurde der linke Leberlappen entnommen (**Bild 2.3**). Beide Leberlappen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert (Herfreeze, Heraeus, Hanau). Es wurden jeweils 5-6 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Lösung A

NaCl	115 mM
NaHCO ₃	25 mM
KCl	5,9 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1,18 mM
NaH ₂ PO ₄	1,23 mM
Na ₂ SO ₄	1,2 mM
HEPES	20 mM
EGTA	0,5 mM

Lösung B

NaCl	115 mM
NaHCO ₃	25 mM
KCl	5,9 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1,18 mM
NaH ₂ PO ₄	1,23 mM
Na ₂ SO ₄	1,2 mM
HEPES	20 mM
EGTA	0,5 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2,5 mM
Collagenase H	0,05% (V/V)
pH-Wert 7,5 einstellen	

Percoll™ Gradient

NaCl	136 mM
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	10,2 mM
KCl	2,68 mM
KH ₂ PO ₄	1,46 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,5 mM
Percoll™ Lösung	50% (V/V)

Hank's balanced salt solution (HBSS)

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,95 mM
KCl	5,3 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,49 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,41 mM

NaCl	136,75 mM
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	0,34 mM
HEPES	20 mM
pH-Wert 7,35 einstellen	

Medium199, versetzt mit:

Glukose	8,3 mM
Glutamin	2 mM
Dexamethason	2,5 µg/ml
Penicillin G	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
BSA	50 µg/ml
Insulin	125 U/l
HEPES	10 mM

Zugabe von 5% (V/V) Fötalem Kälberserum (FKS) für 4h Vorkultivierung

Trypan Blau Lösung

Trypan Blau	0,08 g
NaCl	0,03 g
H ₂ O	ad 20 ml

2.3.3 KULTIVIERUNG

Die Zellen wurden in einem Brutschrank (Heracell, Heraeus, Hanau) bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert.

2.3.4 ISOLIERUNG PRIMÄRER HEPATOZYTEN

Die Isolierung primärer Rattenhepatozyten wurde von Herrn Dr. T. Gerwig (Gerwig, 2002) und Frau S. Kulhanek-Heinze, Department Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Bei der verwendeten Methode (Seglen, 1973; Immenschuh *et al.*, 1998; de Groot und Brecht, 1991) wurde zunächst die extrazelluläre Matrix des Lebergewebes verdaut. Durch anschließende PercollTM Dichtegradientenzentrifugation wurde eine Zellsuspension gewonnen. Die Abtrennung der Hepatozyten erfolgte aufgrund ihrer im Vergleich zu anderen Leberzellen sehr hohen Dichte durch Zentrifugation bei niedriger Umdrehungszahl.

Alle benötigten Instrumente wurden vor Gebrauch autoklaviert oder hitzesterilisiert, um die Möglichkeit einer Kontamination zu verringern.

Die Tiere wurden zunächst durch eine intraperitoneale Injektion von Narcoren[®] (50 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert und der Bauchraum nach Desinfektion mit Ethanol 70% (V/V) geöffnet. Die Portalvene wurde kanüliert und mit Lösung A (37°C, begast mit 95% O₂ und 5% CO₂, Linde, Unterschleißheim) perfundiert. Der Abfluss des Perfusats erfolgte über die untere Hohlvene. Die Leber wurde bis zur Blutleere 4-7 min lang mit Lösung A durchgespült. Danach wurde mit Lösung B, die Collagenase H enthält, weiter perfundiert, wobei kurz zuvor die Kanüle der unteren Hohlvene mit der Kanüle der Portalvene verbunden wurde, um eine rezirkulierende Perfusion zu gewährleisten.

Nach weiteren 6-8 min wurde die verdaute Leber operativ entfernt und in eine Petrischale mit Lösung B gelegt. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden nun in einem Laminar Air Flow (Herasafe, Heraeus, Hanau) durchgeführt. Die Leber wurde vorsichtig mit einem kleinen Löffel ausgekratzt. Die so gewonnene Zellsuspension wurde durch ein Falcon Zellsieb (100 µm, BD Labware, Bedford, MA, USA) gefiltert und 10 min zur Sedimentation stehen gelassen. Der Überstand wurde verworfen und die Zellsuspension in einem neuen 50 ml Zentrifugationsröhrchen auf 50% (V/V) Percoll[™] Lösung geschichtet. Nach Zentrifugation bei 650 x g für 10 min bei 4°C wurde der Überstand verworfen und das verbleibende Pellet in Lösung B resuspendiert. Die Zellzahl und die Vitalität der Zellen wurde mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Als Maß für die Vitalität wurde die Zahl toter Zellen durch Zugabe von Trypan Blau Lösung bestimmt (500 µl Trypan Blau Lösung, 450 µl Lösung B, 50 µl Zellsuspension). Die Hepatozyten wurden in einer Konzentration von 10⁶ Zellen/ml in mit Collagen R beschichteten (0,2 mg/ml, Serva, Heidelberg) 6-Loch-Zellkulturplatten (Peske, Aindling-Pichl) kultiviert. Die Zellen wurden in 1,5 ml Medium199 mit Fötalem Kälberserum (FKS) ausgesät. Nach 4 h Inkubation wurden die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen und anschließend Medium199 ohne FKS zugegeben.

Die Zellen wurden 48 h später für die Experimente verwendet. Dabei wurde das Medium nach 24 h und nach 36 h gewechselt. Nach entsprechender Behandlung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und bei -80°C eingefroren.

2.4 BAKTERIEN

2.4.1 EINGESETZTER STAMM

Zur Amplifizierung des Plasmids für den RNA Electrophoretic Mobility Shift Assay (siehe 2.6) wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α TM (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

2.4.2 NÄHRMEDIEN UND ANTIBIOTIKA

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in LB-Medium pH 7,5. Bei der Herstellung kompetenter Bakterienzellen (siehe 2.6.3.1) wurden die Bakterien in SOB-Medium pH 7,0 hochgezogen. Beide Medien wurden vor Gebrauch 15 min bei 2 bar und 121°C autoklaviert. LB Broth Base, Trypton und Hefeextrakt wurden von Gibco/Invitrogen, Karlsruhe bezogen.

LB-Medium pH 7,5

LB Broth Base	20 g
Glukose	1 g
H ₂ O	ad 1000 ml

pH-Wert mit NaOH auf 7,5 einstellen

SOB-Medium pH 7,0

Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,58 g
1 M KCl	0,5 ml
1 M MgCl ₂	10 ml
1 M MgSO ₄	10 ml

pH-Wert mit NaOH auf 7,0 einstellen

Die Selektion erfolgreich transformierter Bakterien erfolgte durch Zusatz von Ampicillin (in 70% (V/V) Ethanol gelöst, Endkonzentration 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) zum Medium. Das Ampicillin wurde jeweils bei Bedarf frisch zugesetzt. Nur die Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, sind fähig, β -Lactamase zu bilden, ein Enzym, welches den β -Lactam-Ring von

Ampicillin spaltet und somit Resistenz gegen β -Lactamantibiotika wie z.B. Ampicillin verleiht.

Die Selektion einzelner Klone der transformierten Bakterien erfolgte auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten. Diese wurden wie folgt hergestellt: 32 g LB Agar (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) und 1 g Glukose wurden in 1 l destilliertem Wasser aufgelöst, 15 min bei 2 bar und 121°C autoklaviert und anschließend auf ca. 50°C abgekühlt. Nach Zusatz von Ampicillin in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ wurde die Lösung in Petrischalen (\varnothing 100 mm, Peske, Aindling-Pichl) gegossen und nach dem Erkalten bei 4°C gelagert.

2.4.3 KULTIVIERUNG

E. coli wurden unter aeroben Bedingungen in 15 ml Falcon Tubes (Peske, Aindling-Pichl) oder in 100 ml Erlenmeyer Kolben unter kräftigem Schütteln (300 rpm) in einem Unihood 550 Inkubator (Uniequip, Martinsried) bei 37°C kultiviert.

Zur Kurzzeitlagerung wurden die LB-Agarplatten mit den Bakterienkolonien bei 4°C gelagert.

2.5 VEKTOREN

2.5.1 VERWENDETE PLASMIDE

Zur Herstellung einer [$\alpha^{32}\text{P}$]-markierten IRE-Probe für den RNA Electrophoretic Mobility Shift Assay wurde wie unter 2.6.4 beschrieben das Plasmid I-12.CAT (Pantopoulos und Hentze, 1995), das uns freundlicherweise von Herrn Dr. S. Müller, Universität Heidelberg, zur Verfügung gestellt wurde, *in vitro* transkribiert. Dieses Plasmid besteht aus dem pGEM[®]3Zf-Vektor (3197 bp) mit einem etwa 830 bp langen Insert, welches sich aus einer IRE- (Iron Responsive Element) (26 bp) und einer für Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) codierenden Sequenz zusammensetzt. Die CAT-Sequenz war für unsere Versuche nicht von Bedeutung. Sie wird z.B. beim Reporteragen-Assay zur Untersuchung der Transkriptionsaktivität von vorangeschalteten Promotoren benötigt. Das Plasmid enthält außerdem eine für β -Lactamase codierende Region, was eine Selektion in ampicillinhaltigem Medium ermöglichte. Durch Restriktionsverdau mit Xba I (MBI Fermentas, St. Leon Roth) wurde das Plasmid linearisiert. Bei anschließender *in vitro*

Transkription mit T7 RNA-Polymerase (MBI Fermentas, St. Leon Roth) wurde eine antisense Probe generiert.

2.6 RNA ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY

Die Bindungsaktivität des Iron Regulatory Protein-1 (IRP-1) an das Iron Responsive Element wurde mittels RNA Electrophoretic Mobility Shift Assay (REMSA) untersucht. Bei dieser Methode werden zunächst aus den zu untersuchenden Lebern bzw. Hepatozyten zytoplasmatische Extrakte bereitet, die das im Zytosol vorliegende IRP-1 enthalten. Anschließend werden diese Proteinextrakte mit einer [$\alpha^{32}\text{P}$]-markierten IRE-Probe, die im Überschuss zugegeben wird, inkubiert. Danach erfolgt eine gelelektrophoretische Auftrennung. Die freien, nichtgebundenen IRE-Proben wandern im elektrischen Feld aufgrund ihrer kleineren Größe schneller als die, an die IRP-1 gebunden ist. Die RNA-Proteinkomplexe können durch Autoradiographie und Auswertung am Phosphoimager als Banden sichtbar gemacht werden. Die Stärke der Bande gibt Aufschluss über die Stärke der Bindungsaktivität.

2.6.1 PROBENVORBEREITUNG

2.6.1.1 Lösungen

Zytoplasmatischer Lysepuffer pH 7,4

Triton X-100	1% (V/V)
KCl	40 mM
Tris-HCl	25 mM
pH-Wert 7,4 einstellen	

Kurz vor Gebrauch wurde dem Lysepuffer der Protease-Inhibitor PMSF (gelöst in Isopropanol, Endkonzentration 0,1 mM) und der Protease-Inhibitor Mix Complete[®] (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers zugesetzt.

2.6.1.2 Herstellung zytoplasmatischer Extrakte aus Rattenlebern

Alle Arbeitsschritte wurden in einem Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Die Lebern wurden während der Extrakterstellung auf Trockeneis gelagert. 100 mg Leber wurden mit 1 ml eiskaltem Lysepuffer versetzt und mit einem Potter S Gerät (Braun Biotech, Melsungen)

homogenisiert. Anschließend wurden die Homogenate 2 x 10 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Für die nachfolgende Proteinbestimmung und für den RNA Electrophoretic Mobility Shift Assay wurden mit Lysepuffer hergestellte 1:10-Verdünnungen der klaren Überstände verwendet.

2.6.1.3 Herstellung zytoplasmatischer Extrakte aus Rattenhepatozyten

Die Hepatozyten wurden in 6-Loch-Zellkulturplatten in An- oder Abwesenheit von ANP (200 nM) kultiviert, mit 200 µl Lysepuffer, dem PMSF und Complete® in den unter 2.6.1.1 angegebenen Konzentrationen zugesetzt wurde, versetzt und mit einem Zellschaber vom Boden abgelöst. Die so gewonnene Zellsuspension wurde in Reaktionsgefäße überführt und mit einem Ultraschallstab (Sonopuls Homogenisator, Bandelin Electronic GmbH, Berlin) behandelt, um die DNA zu zerkleinern und damit die Viskosität der Lösung herabzusetzen. Anschließend wurden die Homogenate 2 x 10 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Für die nachfolgende Proteinbestimmung und für den RNA Electrophoretic Mobility Shift Assay wurden die unverdünnten klaren Überstände verwendet.

2.6.2 MESSUNG DER PROTEINKONZENTRATION

Die Proteinkonzentration der gewonnenen zytoplasmatischen Extrakte für den RNA Electrophoretic Mobility Shift Assay wurde nach der Lowry-Methode (Lowry *et al.*, 1951) bestimmt. Diese Methode beruht auf der Reaktion bestimmter Aminosäuren eines Proteins, hauptsächlich Tyrosin und Tryptophan, mit einem Gemisch aus Natriummolybdat und Natriumwolframat in Phosphorsäure, den aktiven Bestandteilen des Phenolreagenz nach Folin-Ciocalteu. Die Aminosäuren reduzieren das Gemisch aus Metallsäuren, wobei eine oder mehrere Verbindungen mit einer charakteristischen blauen Farbe entstehen. Der Elektronentransfer auf das Metallsäuregemisch wird durch die Chelatbildung von Cu^{2+} mit dem Peptidrückgrat erleichtert.

2.6.2.1 Lösungen

Reagenz A

Na_2CO_3	10 g
0,1 M NaOH	ad 500 ml

Reagenz B

Na/K tartrat	0,5 g
CuSO ₄	0,25 g
H ₂ O	ad 50 ml

Reagenz 1

Alkalische Kupfer Lösung: 50 Teile Reagenz A + 1 Teil Reagenz B

Reagenz 2

Verdünntes Folin's Reagenz: 1 Teil Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz + 1 Teil H₂O

Reagenz 1 und Reagenz 2 wurden jeweils kurz vor Gebrauch frisch hergestellt.

2.6.2.2 Durchführung

Die zu bestimmenden Proteinlösungen wurden zunächst nach Bedarf mit Wasser verdünnt und 200 µl dieser Verdünnung in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 1 ml Reagenz 1 wurden die Proben gut gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 100 µl Reagenz 2 zugegeben, wiederum gut gemischt und die Proteinlösungen nochmals für mind. 30 min stehen gelassen. Danach wurde in einem Lambda Bio 20 Photometer (PerkinElmer Instruments, Überlingen) die Absorption bei 500 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Eichgerade, die mit unterschiedlichen Verdünnungen von BSA (Rinderserumalbumin, 0-250 µg/ml) erstellt wurde, berechnet.

2.6.3 AMPLIFIZIERUNG EINER DNA-SONDE

Das unter 2.5.1 beschriebene Plasmid, das zur *in vitro* Transkription und damit zur Generierung einer [α^{32} P]-markierten IRE-Probe für den RNA Electrophoretic Mobility Shift Assay verwendet wurde, wurde zunächst amplifiziert. Dazu wurden kompetente *E. coli* Bakterien hergestellt, welche in der Lage sind, extern zugeführte Plasmid-DNA aufzunehmen. Anschließend wurden diese kompetenten Bakterien transformiert und auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten selektiert. Um zu überprüfen, ob die Transformation erfolgreich war, wurde die eingebrachte Plasmid-DNA in kleinem Maßstab isoliert und mittels Agarose-Gelelektrophorese identifiziert. Größere Mengen an gereinigter Plasmid-DNA konnten anschließend mit dem Qiagen[®] Plasmid Midi Kit gewonnen werden.

2.6.3.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Behandlung von Bakterien mit Calciumchlorid und Rubidiumchlorid verleiht Bakterien die Fähigkeit, Plasmid-DNA aufzunehmen, wodurch sie zu kompetenten Bakterienzellen werden.

Lösungen:

Lösung A

3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	10 mM
Rubidiumchlorid	10 mM
pH-Wert 7,0 einstellen	

Lösung B

MOPS	100 mM
CaCl ₂	50 mM
Rubidiumchlorid	10 mM
pH-Wert 6,5 einstellen	

Durchführung:

E. coli DH5 α wurden in 20 ml LB-Medium bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD 600_{nm}) von 0,3 bis 0,5 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 4°C und 15000 rpm zentrifugiert und das entstandene Pellet in 1 ml eiskalter Lösung A resuspendiert. Nach Auffüllen des Volumens mit Lösung A auf 10 ml wurde nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Lösung B resuspendiert. Das Volumen wurde wiederum auf 10 ml mit Lösung B aufgefüllt und die Lösung 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation und Resuspension in Lösung B wurde 10% (V/V) Glycerin zugegeben und die kompetenten Bakterien bei -80°C gelagert.

2.6.3.2 Transformation

Die Transformation von *E. coli*, also die Aufnahme von externer DNA in Bakterienzellen, wurde zum ersten Mal von Mandel und Higa beschrieben (Mandel und Higa, 1970).

50 μ l kompetente *E. coli* DH5 α Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 15 ng Plasmid-DNA inkubiert. Hierbei lagert sich die DNA an die Bakterien an. Die Suspension wurde dann 90 sec bei 42°C erhitzt und danach nochmals für 1-2 min auf Eis gestellt. Beim Hitzeschock wandert das Plasmid ins Zellinnere. Anschließend wurden die Bakterien unter kräftigem Schütteln (300 rpm) in 2 ml LB-Medium 50 min bei 37°C kultiviert und 10 min bei

Raumtemperatur und 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Pellet in 0,5 ml LB-Medium resuspendiert. 50 µl der Bakteriensuspension wurden mit einem Drygalski-Spatel auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Bakterien, die erfolgreich transformiert worden waren, konnten aufgrund ihrer neu erworbenen Ampicillinresistenz in einzelnen Kolonien wachsen. Als Negativkontrolle wurden Bakterien ohne Plasmid eingesetzt.

2.6.3.3 Schnellisolierung der amplifizierten Plasmid-DNA

Zur Überprüfung der Transformation wurde nun die Plasmid-DNA in kleinem Maßstab aus den Bakterien isoliert. Die verwendete Methode beruht auf einer alkalischen Lyse der Bakterien mit anschließender Ethanolpräzipitation der Plasmid-DNA (Birnboim und Doly, 1979).

Zunächst werden einzelne Kolonien, die über Nacht auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte gewachsen sind, in LB-Medium vermehrt. Anschließend werden die Bakterien mit SDS in einer stark alkalischen Lösung lysiert. SDS schließt die Phospholipide und die Proteinbestandteile der Zellwand auf, was zu einer Lyse der Zelle führt. Chromosomale DNA, Proteine und die Bestandteile der Zellwand werden durch NaOH denaturiert und schließlich durch Zugabe eines Neutralisationspuffers, der eine hohe Konzentration an Kaliumacetat enthält, gefällt. Die in der Lösung verbleibende Plasmid-DNA wird renaturiert und kann dann nach Abtrennung des denaturierten Materials durch Ethanolpräzipitation aus dem Überstand gewonnen werden.

Lösungen:

Alkalischer Lysepuffer I

Glukose	50 mM
Tris-HCl	25 mM
EDTA	10 mM
pH-Wert 8,0 einstellen	

Alkalischer Lysepuffer II

NaOH	200 mM
SDS	1% (m/V)

Alkalischer Lysepuffer III

Kaliumacetat	3 M
Essigsäure	5 M

TE-Puffer pH 8,0

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM

pH-Wert 8,0 einstellen

Durchführung:

2 ml ampicillinhaltiges LB-Medium wurden in einem sterilen 15 ml Falconröhrchen mit einer einzelnen Kolonie transformierter Bakterien beimpft und über Nacht bei 37°C unter kräftigem Schütteln (300 rpm) inkubiert. 0,5 ml der Übernachtskultur wurden in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Sie wurde später für die Plasmidisolierung mit dem Qiagen® Plasmid Midi Kit (siehe 2.6.3.5) benötigt. Die restliche Kultur wurde 1 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Pellet in 100 µl Alkalischem Lysepuffer I resuspendiert. 200 µl frisch hergestellter Alkalischer Lysepuffer II wurden zugegeben und mit der Zellsuspension durch mehrmaliges Umdrehen vorsichtig vermischt. Nach Zugabe von 150 µl eiskaltem Alkalischen Lysepuffer III wurde ebenfalls vorsichtig gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Das Bakterienlysat wurde dann 5 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe des doppelten Volumens an eiskaltem Ethanol abs. und 30 min Inkubation bei -80°C gefällt. Anschließend konnte die Plasmid-DNA durch 10 min Zentrifugation bei 4°C und 14000 rpm abgetrennt werden. Das Pellet wurde mit 1 ml EtOH 70% (V/V) gewaschen, im SpeedVac® Vakuumpkonzentrator (Savant SC110A, Savant Instruments, Holbrook, NY, USA) getrocknet und in 50 µl TE-Puffer pH 8,0 gelöst.

2.6.3.4 Agarose-Gelelektrophorese**Lösungen:****10 x TBE-Puffer**

Tris	900 mM
Borsäure	889 mM
EDTA	25 mM

Durchführung:

Die isolierte Plasmid-DNA wurde durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.7.3) identifiziert. Als Gelmatrix diente 1% (m/V) Agarose (SeaKem[®] LE Agarose, BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME, USA) in 1 x TBE-Puffer, der aus der Stocklösung (10 x) hergestellt wurde. Das Gel wurde zusätzlich mit Ethidiumbromid (EtBr), einem fluoreszierenden und in die DNA interkalierenden Farbstoff, in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml versetzt. Die Agaroselösung wurde nach Erwärmen in der Mikrowelle in eine horizontale Gelkammer (Easycast, Owl Separation Systems, Portsmouth, NH, USA) gegossen. 10 µl der Plasmid-DNA wurden mit 4 µl kommerziell erhältlichem Ladepuffer (Blue/Orange 6 x Loading Dye, Promega, Heidelberg) und 6 µl H₂O gemischt und bei 80 V geelektrophoretisch (Netzanschlussgerät: PowerPac 300, BioRad, München) aufgetrennt. 150 ng des reinen Plasmids wurden ebenfalls aufgetragen und dienten als Kontrolle. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht (254 nm) an einer Kodak Image Station (Eastman Kodak Company, Rocester, NY, USA).

2.6.3.5 Plasmidisolierung mit Qiagen[®] Plasmid Midi Kit

Zur Gewinnung größerer Mengen an gereinigter Plasmid-DNA wurde der Qiagen[®] Plasmid Midi Kit (Qiagen GmbH, Hilden) verwendet. Die Isolierung beruht auf einer alkalischen Lyse (siehe 2.6.3.3), gefolgt von einer chromatographischen Aufreinigung der DNA über Anionenaustauschersäulen. Während die Plasmid-DNA bei niedriger Salzkonzentration und geeignetem pH-Wert an die Säulen bindet, können RNA, Proteine und andere niedermolekulare Verunreinigungen durch Waschen der Säule abgetrennt werden. Die Plasmid-DNA kann dann mit einem Puffer hoher Salzkonzentration von der Säule eluiert und durch eine Präzipitation mit Isopropanol angereichert werden.

Lösungen:**Puffer P1**

Tris-HCl	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A	100 µg/ml
pH 8,0	

Puffer P2

NaOH	200 mM
SDS	1% (m/V)

Puffer P3

Kaliumacetat	3 M
pH 5,5	

Puffer QBT

NaCl	750 mM
MOPS	50 mM
Isopropanol	15% (V/V)
Triton-X 100	0,15% (V/V)
pH 7,0	

Puffer QC

NaCl	1 M
MOPS	50 mM
Isopropanol	0,15% (V/V)
pH 7,0	

Puffer QF

NaCl	1,25 M
Tris-HCl	50 mM
Isopropanol	15% (V/V)
pH 8,5	

TE-Puffer pH 8,0

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM
pH-Wert 8,0 einstellen	

Durchführung:

Zunächst wurden 200 µl der im Kühlschrank aufbewahrten Bakterienkulturen (siehe 2.6.3.3), bei denen die Transformation erfolgreich war, in 25 ml ampicillinhaltigem LB-Medium über Nacht bei 37°C unter kräftigem Schütteln (300 rpm) inkubiert und anschließend bei 6000 x g

und 4°C 15 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer P2 wurde die Bakteriensuspension durch mehrmaliges Umdrehen vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 4 ml eiskalter Puffer P3 zugegeben, wiederum sofort vorsichtig gemischt, der Ansatz in eine QIAfilter Spritze gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach der Inkubation wurde die Probe auf eine mit 4 ml Puffer QBT equilibrierte Qiagensäule (Qiagen-tip 100) gespritzt. Die Säule wurde mit 2 x 10 ml Puffer QC gewaschen, bevor die Plasmid-DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert wurde. Durch Mischen der eluierten DNA mit 3,5 ml Isopropanol und 30 min Zentrifugation bei 4°C und 15000 x g wurde die Plasmid-DNA präzipitiert. Das Pellet wurde mit 2 ml EtOH 70% (V/V) gewaschen, anschließend an der Luft getrocknet und in 100 µl TE-Puffer pH 8,0 aufgenommen. Die Konzentration an DNA wurde wie unter 2.7.2 beschrieben bestimmt.

2.6.4 IN VITRO TRANSKRIPTION MIT RADIOAKTIV-MARKIERTEN NUKLEOTIDEN

Die Herstellung einer [$\alpha^{32}\text{P}$]-markierten IRE-Probe für den RNA Electrophoretic Mobility Shift Assay (REMSA) erfolgte durch *in vitro* Transkription des Plasmids I-12.CAT (siehe 2.5.1). Das Plasmid wurde dazu durch Verdau mit dem Restriktionsenzym Xba I linearisiert, so dass es am 3'-Ende der einklonierten IRE-codierenden Sequenz endet. Auf diese Weise wird die gezielte Transkription der gewünschten Sequenz ermöglicht und die Bildung sehr langer Transkripte durch die für die Transkription verwendete T7 RNA-Polymerase vermieden und es kann eine radioaktiv-markierte RNA-Probe synthetisiert werden. Das Plasmid, das als DNA Matrize dient, und nicht eingebaute Nukleotide müssen anschließend entfernt werden, um eine optimale Sensitivität des REMSA zu gewährleisten.

2.6.4.1 Restriktionsverdau

Das Plasmid I-12.CAT wurde mit Xba I (MBI Fermentas, St. Leon Roth) im dazugehörigen Puffer Y⁺/TangoTM (MBI Fermentas, St. Leon Roth) verdaut.

Reaktionsansatz:

Plasmid-DNA	20 µg
Xba I	4 µl
Puffer Y ⁺ /Tango TM	4 µl
H ₂ O	ad 40 µl

Der Reaktionsansatz wurde auf Eis zusammenpipettiert, gemischt und 1 h bei 37°C inkubiert. Um zu überprüfen, ob das Plasmid erfolgreich und vollständig geschnitten wurde, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.7.3.2) durchgeführt (5 µl aus Restriktionsverdau, 3 µl Ladepuffer, 10 µl H₂O). Als Größenstandard wurde ein kommerziell erhältlicher Marker (Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder, MBI Fermentas, St. Leon Roth) eingesetzt (3 µl Marker, 3 µl Ladepuffer, 12 µl H₂O).

2.6.4.2 Aufreinigung der Plasmid-DNA

Nach dem Restriktionsverdau erfolgte eine Aufreinigung des Plasmids durch eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkoholextraktion. Dies ist eine Standardmethode zur Entfernung von Proteinen (z.B. Restriktionsenzymen) aus Nukleinsäurelösungen. Da Phenol ein guter Wasserstoffbrückenbildner ist und gleichzeitig hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäure-Seitenketten ausbilden kann, kann es Protein-Nukleinsäure-Komplexe dissoziieren, die Proteine werden denaturiert und reichern sich in der Phenolphase an. In der Praxis benutzt man ein spezielles Gemisch aus 25 Teilen Phenol, 24 Teilen Chloroform und 1 Teil Isoamylalkohol. Chloroform denaturiert die Proteine, während Isoamylalkohol das Schäumen und das Ausbilden einer intensiven Interphase verhindert.

Durchführung:

Zum Restriktionsansatz wurde nach abgeschlossenem Verdau ein gleicher Volumenteil einer Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Mischung (Sigma, Taufkirchen) zugesetzt. Es wurde bis zur Bildung einer Emulsion gevortext und anschließend 5 min bei Raumtemperatur und 14000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Extraktion noch zweimal wie oben beschrieben wiederholt. Dann wurde dreimal mit Chloroform allein extrahiert. Nach Zugabe von 1/10 des Volumens an 5 M NaCl-Lösung und des 2,5fachen Volumens an eiskaltem Ethanol abs. wurde der Ansatz 30 min bei -80°C inkubiert. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde auf diese Weise gefällt und konnte durch die folgende Zentrifugation (10 min, 4°C und 14000 rpm) abgetrennt werden. Das Pellet wurde zweimal mit EtOH 70% (V/V) gewaschen, 5 min im SpeedVac® Vakuumpkonzentrator (Savant SC110A, Savant Instruments, Holbrook, NY, USA) getrocknet und in 10 µl H₂O aufgenommen.

2.6.4.3 Synthese einer radioaktiv-markierten cRNA

Die *in vitro* Transkription für die Synthese einer [$\alpha^{32}\text{P}$]-markierten IRE-Probe wurde mit dem RNA Transcription Kit (Stratagene, Heidelberg), der T7 RNA-Polymerase (MBI Fermentas, St. Leon Roth) und [$\alpha^{32}\text{P}$]UTP (3000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Als RNase-Inhibitor wurde RNasin 40 U/ μl (Promega, Heidelberg) verwendet. Der 5 x Transkriptionspuffer wurde von MBI Fermentas, Heidelberg bezogen.

Reaktionsansatz:

Plasmid I-12.CAT	2 μg
10 mM A/C/GTP	2 μl
1mM UTP	2 μl
[$\alpha^{32}\text{P}$]UTP 3000 Ci/mmol	3 μl
0,75 M DTT	0,8 μl
RNasin 40 U/ μl	0,75 μl
5 x Transkriptionspuffer	4 μl
T7 RNA-Polymerase 20 U/ μl	1 μl
RNase-freies H ₂ O	ad 20 μl

Der Reaktionsansatz wurde auf Eis pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert.

2.6.4.4 DNase-Verdau

Nach erfolgter *in vitro* Transkription wurde das Plasmid durch DNase-Verdau entfernt. Dazu wurden dem Reaktionsansatz 2 μl RQ1-DNase (Promega, Heidelberg) zugegeben und nochmals 15 min bei 37°C inkubiert.

2.6.4.5 Aufreinigung der cRNA

Zur Abtrennung der DNase und der nicht eingebauten Nukleotide wurde der Reaktionsansatz mit dem QIAquick[®] Nucleotide Removal Kit (Qiagen GmbH, Hilden) aufgereinigt. Dabei werden speziell entwickelte Säulen mit einer Silicagel-Membran eingesetzt. Die radioaktiv-markierte RNA bindet bei einer hohen Salzkonzentration und einem pH-Wert < 7,5 an die Membran, während Verunreinigungen wie z.B. Salze oder Enzyme und auch die kurzen Nukleotidbausteine nicht binden und durch mehrmaliges Waschen der Säule effizient abgetrennt werden können. Die Elution der RNA erfolgt dann im Gegensatz zur Bindung bei niedrigen Salzkonzentrationen und einem pH-Wert zwischen 7,0 und 8,5.

Zur Anreicherung der aufgereinigten [$\alpha^{32}\text{P}$]-markierten IRE-Probe wurde diese anschließend mit Ethanol präzipitiert, gewaschen und in 20 μl TE-Puffer pH 8,0 aufgenommen.

Durchführung:

Nach abgeschlossenem DNase-Verdau wurden dem Reaktionsansatz 10 Volumenteile Puffer PN (Bindungspuffer) zugesetzt. Die Mischung wurde auf eine QIAquick[®] Säule, die auf ein kleines Auffanggefäß gesteckt worden war, pipettiert und 1 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule auf ein neues Auffanggefäß gesteckt. Danach wurden 500 μl Puffer PE (Waschpuffer) zugegeben und wiederum 1 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wiederum verworfen und der Waschvorgang noch ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurde mit einem neuen Auffanggefäß nochmals 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert, um restlichen PE Puffer zu entfernen. Die radioaktiv-markierte RNA wurde mit 100 μl Puffer EB (Elutionspuffer) durch Zentrifugation bei

14000 rpm (1 min) in ein neues Reaktionsgefäß eluiert.

Die Ethanolpräzipitation erfolgte wie unter 2.6.4.2 beschrieben.

Der Einbau an radioaktivem Nukleotid wurde in einem β -Counter (Beckmann LS6500, Multi-purpose Scintillation Counter, Beckmann Instruments, Irvine, CA, USA) bestimmt. 1 μl der radioaktiven Probe wurden mit 5 ml Szintillisationsflüssigkeit (Rotiszint, Roth, Karlsruhe) versetzt und vermessen. Für den REMSA wurde die Probe auf eine Aktivität von 25000 cpm/ μl verdünnt.

2.6.5 BINDUNGSREAKTION UND GELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG

2.6.5.1 Lösungen

Bindungspuffer

Triton X-100	1% (V/V)
KCl	40 mM
Tris-HCl	25 mM
pH-Wert 7,4 einstellen	

Ladepuffer

Bromphenolblau	0,5% (m/V)
Glycerin	80% (V/V)

2.6.5.2 Bindungsreaktion

10 µg zytoplasmatischer Extrakt (siehe 2.6.1) wurden mit Bindungspuffer auf 10 µl aufgefüllt und mit 1 µl der [$\alpha^{32}\text{P}$]-markierten IRE-Probe (siehe 2.6.4), die zuvor mit RNase-freiem H_2O auf 25000 cpm/µl verdünnt, 2 min bei 95°C denaturiert und wieder auf Eis abgekühlt wurde, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zur Aufhebung unspezifischer Bindungen 1 µl Heparin (50 mg/ml) zugegeben und weitere 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 3 µl Ladepuffer wurden die Proben gelektrophoretisch aufgetrennt.

Als Positivkontrolle wurde humanes rekombinantes IRP-1 (MBI Fermentas, St. Leon Roth) eingesetzt. Die Bindungsfähigkeit des rekombinanten IRP-1 an die [$\alpha^{32}\text{P}$]-markierte IRE-Probe musste vor der eigentlichen Bindungsreaktion zunächst durch Zugabe von 100 mM N-Acetyl-L-Cystein (MBI Fermentas, St. Leon Roth) voll aktiviert werden. N-Acetyl-L-Cystein ist in der Lage, Disulfidbrücken, die die drei Cysteinreste im IRP-1 Molekül ausbilden könnten und die die Bindungsaktivität an die IRE-Probe herabsetzen, zu reduzieren. 2 µl rekombinantes IRP-1 wurden daher mit 3 µl binding buffer (50 µl 125 mM K-HEPES pH 7,6; 40 mM Kaliumacetat; 7,5 mM MgCl_2 ; 25% (V/V) Glycerin; MBI Fermentas, St. Leon Roth), 4,5 µl RNase-freies H_2O und 1,5 µl N-Acetyl-L-Cystein gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte die Bindungsreaktion mit der radioaktiv-markierten IRE-Probe wie oben beschrieben.

Zur Überprüfung, ob gleiche Mengen an Protein für den REMSA eingesetzt wurden, wurde in das Reaktionsgefäß vor Zugabe der zytoplasmatischen Extrakte und des Bindungspuffers 1 µl verdünnte 2-Mercaptoethanol-Lösung (1:4-Verdünnung mit Bindungspuffer) vorgelegt. 2-Mercaptoethanol kann als Reduktionsmittel wie N-Acetyl-L-Cystein die Bindungsaktivität von IRP-1 auf das Maximum erhöhen.

2.6.5.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der RNA-Proteinkomplexe erfolgte auf 0,75 mm dicken 5% nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gelen in einer Mini-Gel Apparatur von BioRad (Mini Protean II, München). Dabei handelt es sich um ein Vertikalsystem, bei dem zwei Läufe parallel durchgeführt werden können.

Zur Herstellung von Polyacrylamid-Gelen wurde eine Polyacrylamid/Bisacrylamid Stammlösung (Rotiphorese Gel 30) der Firma Roth (Karlsruhe) verwendet.

5% nicht-denaturierende Gele:

30% PAA-Lösung	2,5 ml
10 x TBE	1,5 ml
H ₂ O	11 ml
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	7,5 µl
APS (Ammoniumperoxodisulfat) 10% (m/V)	112,5 µl

Zunächst wurden die ersten drei Bestandteile gemischt und 10 min mit einer Vakuumpumpe entgast, um anaerobe Bedingungen für die Polymerisation zu erhalten, dann wurden TEMED (Vernetzer) und APS (Polymerisationsstarter) zugegeben.

10 x TBE

Tris	53,9 g
Borsäure	27,5 g
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	3,72 g
H ₂ O	ad 500 ml

pH-Wert 8,3 einstellen

Nach abgeschlossener Polymerisation wurde vor dem Auftragen der Proben zunächst ein Vorlauf in 1 x TBE (30 min, 90 V) durchgeführt. Anschließend wurden die Proben in die Geltaschen gefüllt und ebenfalls bei 90 V ca. 1 h aufgetrennt (Netzanschlussgerät: PowerPac 300, BioRad, München).

2.6.5.4 Detektion

Die RNA-Proteinkomplexe wurden nach der Elektrophorese durch Auflegen eines Cyclone™ Storage Phosphor Screens (Canberra-Packard GmbH, Dreieich) und anschließender Auswertung mit Optiquant™ Software am Phosphoimager (Cyclone™ Storage Phosphor System, Canberra-Packard GmbH, Dreieich) detektiert. Die Phosphor Screens sind auf einer Seite mit einer dünnen Schicht aus BaFBr:Eu²⁺ Phosphorkristallen beschichtet, die die Energie der radioaktiven Strahlung absorbieren und diese später, wenn sie von rotem Laserlicht angeregt werden, wieder als blaues Licht abgeben.

2.7 ISOLIERUNG VON RIBONUKLEINSÄUREN

Zur Prävention des Abbaus von Ribonukleinsäuren durch RNasen wurden bei der Isolierung von totaler RNA (totRNA) bestimmte Vorsichtsmaßnahmen zur Vermeidung der Kontamination eingehalten. Zu Beginn der Isolierung wurden den Präparationen RNase-Inhibitoren wie z.B. 2-Mercaptoethanol oder Guanidiniumthiocyanat zugesetzt. Alle Arbeitsschritte wurden mit Handschuhen durchgeführt, Geräte hitzesterilisiert (180°C, 3 h) und die verwendeten Lösungen vor Gebrauch sterilfiltriert oder bei 2 bar und 121°C 15 min autoklaviert.

2.7.1 EXTRAKTION VON RIBONUKLEINSÄUREN

Die Extraktion von Ribonukleinsäuren erfolgte zum einen mit der Guanidiniumthiocyanat-Cäsiumchlorid-Methode (Chirgwin *et al.*, 1979), zum anderen mit dem RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden).

Bei der ersten Methode wird das Gewebe, aus dem intakte RNA isoliert werden soll, zunächst mit Guanidiniumthiocyanat in Anwesenheit von 2-Mercaptoethanol und Natriumlaurylsarkosinat homogenisiert. Guanidiniumthiocyanat ist ein RNase-Inhibitor und ein starkes Detergens, das Proteine denaturiert. In Gegenwart von Reduktionsmitteln (2-Mercaptoethanol) ist es in der Lage, Disulfidbindungen zu spalten. Zusammen mit Natriumlaurylsarkosinat verhindert es die Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen zwischen den Proteinen. Bei der anschließenden Dichtegradientenzentrifugation mit CsCl reichert sich RNA aufgrund ihrer hohen Schwimmdichte am Boden des Zentrifugationsröhrchens an, während Proteine in der Guanidiniumthiocyanatphase verbleiben und sich die DNA in der Interphase anreichert. Mit Hilfe dieser Methode kann sehr reine RNA von hoher Qualität gewonnen werden. Einziger Nachteil ist, dass nur wenige Proben gleichzeitig ultrazentrifugiert werden können, so dass der zeitliche Aufwand bei der Isolierung mehrerer Proben sehr hoch ist. Daher erfolgte die Extraktion von Ribonukleinsäuren später mit dem RNeasy[®] Mini Kit.

Der RNeasy[®] Mini Kit verwendet zur Isolierung von RNA spezielle Säulen mit einer Silicagel-Membran, an die die RNA bei hoher Salzkonzentration binden kann. Andere Zellbestandteile können durch mehrere Waschschrte effizient entfernt und die gereinigte RNA anschließend eluiert werden.

2.7.1.1 Guanidiniumthiocyanat/Cäsiumchlorid-Methode

Guanidiniumthiocyanat wurde von Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen und Cäsiumchlorid von Gibco/Invitrogen, Karlsruhe bezogen.

Lösungen:

Guanidiniumthiocyanat-Lösung

Guanidiniumthiocyanat 47,24 g

0,1 M Tris-HCl pH 7,5 ad 100 ml

Kurz vor Gebrauch wurde 1% (V/V) 2-Mercaptoethanol zugegeben

TE-Puffer

Tris-HCl pH 7,5 10 mM

EDTA pH 8,0 1 mM

Durchführung:

100 mg gefrorene Leberstückchen wurden in 3 ml Guanidiniumthiocyanat-Lösung in einem sterilen 50 ml Zentrifugationsröhrchen 30 sec lang mit einem Ultraturax (Ika Labortechnik, Staufen) auf höchster Stufe homogenisiert. Nach Zugabe von 150 µl 10% (V/V) Natriumlaurylsarcosinat-Lösung (Endkonzentration 0,5%) wurde die Mischung 5 min bei Raumtemperatur und 1500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann vorsichtig auf 1,2 ml 5,7 M Cäsiumchloridlösung (in 0,01 M EDTA) geschichtet und in einer Ultrazentrifuge (Sorvall Discovery 90, Sorvall Kendro Laboratory Products GmbH, Hamburg) 18 h bei 40000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 70% (V/V) Ethanol gewaschen, bei 40°C 30 min getrocknet und in 300 µl TE-Puffer mit 0,1% (m/V) SDS gelöst. Danach wurde die Lösung in ein steriles Reaktionsgefäß überführt, mit 30 µl 3 M Natriumacetat-Lösung pH 5,2 und 750 µl eiskaltem Ethanol abs. versetzt und 30 min bei -80°C gelagert. Auf diese Weise konnte die gewonnene RNA gefällt und durch anschließende Zentrifugation (10 min, 4°C, 14000 rpm) abgetrennt werden. Das Pellet wurde wiederum mit 70% (V/V) Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 250 µl RNase-freiem H₂O gelöst. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.7.1.2 Extraktion mit RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen)

20 mg fein pulverisiertes Lebergewebe wurden mit 600 µl Guanidiniumthiocyanat-haltigem Puffer RLT, dem vor Gebrauch 1% 2-Mercaptoethanol zugegeben wurde, gut gemischt, auf

eine QIAshredder-Säule (Qiagen GmbH, Hilden) gegeben und 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Dies führte zu einer gleichmäßigen Homogenisation der Proben. Zur Abtrennung von Zellbestandteilen wurde der Durchfluss anschließend nochmals 3 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 600 µl Ethanol 70% (V/V), der für optimale Bindungsbedingungen an die Säule sorgt, wurde die Mischung auf eine RNeasy Säule pipettiert und 15 sec bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule auf ein neues Sammelgefäß gesteckt. 700 µl ethanolhaltiger Puffer RW1 wurden zugesetzt und es wurde erneut zentrifugiert (15 sec, 10000 rpm). Danach wurde 2 x mit 500 µl Puffer RWE gewaschen und abschließend zur vollständigen Entfernung des Waschpuffers nochmals zentrifugiert (1 min, 14000 rpm). Die RNA konnte dann mit 2 x 30 µl RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert werden (1 min, 10000 rpm).

2.7.2 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄURELÖSUNGEN

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde photometrisch durch Messen der Absorption bei 260 nm (A_{260}) in Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke bestimmt. Doppelsträngige DNA der Konzentration 50 µg/ml und einzelsträngige RNA der Konzentration 40 µg/ml haben bei 260 nm eine Absorption von 1. Um eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäurelösung machen zu können, wird das Verhältnis A_{260}/A_{280} bestimmt. Dieses sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Starke Absorptionen bei 280 nm weisen auf eine Verunreinigung durch Proteine hin.

Wässrige DNA- und RNA-Lösungen wurden in einem Lambda Bio 20 Photometer (PerkinElmer Instruments, Überlingen) bei 260 und 280 nm vermessen.

2.7.3 GELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON RIBONUKLEINSÄUREN

Agarose-Gelelektrophorese ist eine Standardmethode zur Auftrennung und Reinigung von DNA- und RNA-Fragmenten. Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats bei allen pH-Werten negativ geladen und wandern im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode, wobei die kleineren Fragmente schneller wandern als die größeren. Zur Größenbestimmung und zur Zuordnung von Nukleinsäurefragmenten müssen bei der elektrophoretischen Auftrennung jeweils Größenstandards mit aufgetragen werden. Die Detektion der Nukleinsäuren erfolgt unter UV-Licht bei 254 nm durch einen in das Gel

polymerisierten Farbstoff (EtBr, 0,5 µg/ml), der fluoresziert und in die DNA bzw. RNA interkaliert.

RNA muss vor der Elektrophorese linearisiert werden. Dies geschieht durch Denaturierung mit Glyoxal-DMSO-Phosphat (GDP)-Lösung. Bei der Detektion werden vor allem die beiden Banden der ribosomalen RNA (28S und 18S) sichtbar. Das Verhältnis der beiden Banden, das etwa 2:1 betragen sollte, kann als Maß für die Integrität der RNA herangezogen werden.

2.7.3.1 Lösungen

Glyoxal-DMSO-Phosphat (GDP)

6 M Glyoxal	200 µl
DMSO	595 µl
0,1 M NaH ₂ PO ₄ pH 7,0	117 µl
RNase-freies H ₂ O	300 µl

Ladepuffer

Glycerin	50% (V/V)
NaH ₂ PO ₄ pH 7,0	0,01 M
Bromphenolblau	0,4% (m/V)

2.7.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der isolierten RNA diente 1% (m/V) Agarose (SeaKem[®] LE Agarose, BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME, USA) in 0,01 M NaH₂PO₄ pH 7,0 als Gelmatrix. Ethidiumbromid wurde dem Gel in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgte in einer horizontalen Kammer (Easycast, Owl Separation Systems, Portsmouth, NH, USA).

20 µg RNA wurden in einem SpeedVac[®] Vakuumkonzentrator (Savant SC110A, Savant Instruments, Holbrook, NY, USA) getrocknet, in 20 µl GDP 1 h bei 50°C denaturiert und auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Proben nach Zugabe von 5 µl Ladepuffer auf das Gel aufgetragen und in 0,01 M NaH₂PO₄ pH 7,0 bei 80 V 2-3 h aufgetrennt (Netzanschlussgerät: PowerPac 300, BioRad, München). Der Elektrophoresepuffer wurde mit einer Umwälzpumpe (Millipore, Bedford, MA, USA) während der Elektrophorese ständig rezirkuliert, um die Ausbildung eines H⁺-Gradienten im Elektrophoresepuffer zu vermeiden. Höhere pH-Werte als 8,0 können die Bindung von Glyoxal an die RNA auflösen.

Die Detektion erfolgte unter UV-Licht (254 nm) an einer Kodak Image Station (Eastman Kodak Company, Rocester, NY, USA).

2.8 REVERSE TRANSKRIPTION-POLYMERASE KETTENREAKTION (RT-PCR)

Die Expression von Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde unter anderem mit der Reversen Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) ermittelt. Mit dieser Technik kann die mRNA-Expression eines gewünschten Proteins semiquantitativ bestimmt werden. RNA wird dazu zunächst durch eine Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, anschließend werden Nukleinsäurefragmente definierter Länge und Sequenz in der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Die PCR wurde in den 80er Jahren von Mullis *et al.* entwickelt (Mullis und Faloona, 1987). Die PCR-Produkte können über eine Agarose-Gelelektrophorese und Auswertung unter UV-Licht (254 nm) qualitativ und quantitativ bestimmt werden.

2.8.1 REVERSE TRANSKRIPTION

Für die Reverse Transkription wurde der Reverse Transcription Kit von Promega (Heidelberg) verwendet. Die eingesetzte virale Reverse Transkriptase stammt aus dem aviären Myeloblastosis Virus (AMV-RT, Promega, Heidelberg).

Die für die RT-PCR eingesetzte totRNA wurde mit Hilfe der Guanidinium-thiocyanat/Cäsiumchlorid-Methode (siehe 2.7.1.1) gewonnen.

Reaktionsansatz:

totRNA	50 µg
25 mM MgCl ₂	4 µl
10 x Transkriptionspuffer	2 µl
10 mM dNTP	2 µl
RNase-Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl
Oligo(dT) ₁₅ Primer (500 µg/ml)	1 µl
AMV-RT (20 U/µl)	0,75 µl
RNase-freies H ₂ O	ad 20 µl

Der Reaktionsansatz wurde auf Eis pipettiert und anschließend 5 min bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Zum Beenden der Reaktion wurden die Proben danach 5 min bei 95°C gekocht und wieder auf Eis abgekühlt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.8.2 AMPLIFIZIERUNG SPEZIFISCHER cDNA TEMPLATES

Bei der Polymerase-Kettreaktion wird aus einer einzelsträngigen cDNA ausgehend von einem Startermolekül durch eine DNA-Polymerase ein neuer DNA-Strang synthetisiert. Als Startermoleküle werden synthetische DNA-Oligonukleotide (Primer) verwendet, die an die Matrizen-DNA hybridisieren. Von deren 3'-Ende aus synthetisiert die DNA-Polymerase den neuen DNA-Doppelstrang. Durch die Wahl eines gegenläufig orientierten Primerpaares kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern vervielfältigt werden. Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, wobei die DNA exponentiell amplifiziert wird.

Ein PCR-Zyklus beginnt mit der thermischen Denaturierung des DNA-Doppelstrangs bei 93°C. Danach erfolgt die Primer-Hybridisierung an die einzelsträngige DNA bei 53°C. Die anschließende Amplifikation des dazwischen gelegenen Sequenzabschnitts durch die DNA Taq Polymerase wird bei 73°C durchgeführt. Die DNA Taq Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* ist hitzestabil und erlaubt daher die kontinuierliche Durchführung der PCR-Zyklen ohne weitere Enzymzugabe.

2.8.2.1 Primer und Reaktionsbedingungen

Alle Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen.

Die Primer basieren auf der für die Ratte bekannten Sequenz der GAPDH mRNA (Tso *et al.*, 1985).

GAPDH Ratte Sense Primer:

5'-TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA-3'

GAPDH Ratte Antisense-Primer:

5'-AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT-3'

Amplifikationsprodukt: 308 bp

Reaktionsbedingungen:

1 min	93°C	} 30 Zyklen
24 sec	93°C	
30 sec	53°C	
1 min	73 °C	
10 min	73°C	

2.8.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Für die PCR wurden 25 mM MgCl₂ und 10 mM dNTP aus dem Reverse Transcription Kit von Promega verwendet. Der 10 x Thermophilic DNA-Polymerase Puffer (100 mM Tris-HCl pH 9,0; 500 mM KCl; 1% (V/V) Triton-X 100) und die Taq DNA-Polymerase in Puffer A (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 50% (V/V) Glycerin; 1% (V/V) Triton-X 100) wurden ebenfalls von Promega (Heidelberg) bezogen.

Reaktionsansatz:

cDNA	30 ng
1% (m/V) BSA	0,5 µl
25 mM MgCl ₂	6 µl
10 mM dNTP	1 µl
10 x Thermophilic DNA-Polymerase Puffer	10 µl
GAPDH Ratte Sense Primer (100 pmol/µl)	1 µl
GAPDH Ratte Antisense Primer (100 pmol/µl)	1 µl
Taq DNA-Polymerase in Puffer A (5 U/µl)	0,5 µl
H ₂ O	ad 100 µl

Der Ansatz wurde auf Eis pipettiert und in einem Thermocycler (Gene Amp PCR System 9700, PE Applied Biosystems, Weiterstadt) unter den angegebenen Reaktionsbedingungen amplifiziert.

2.8.3 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Zur qualitativen und quantitativen Untersuchung der PCR-Produkte wurde eine Elektrophorese auf einem 2,5% Agarosegel in 1 x TBE Puffer durchgeführt (siehe 2.7.3 und 2.6.3.4). 20 µl aus dem PCR-Ansatz wurden mit 4 µl Ladepuffer (Blue/Orange 6 x Loading Dye, Promega, Heidelberg) versetzt und bei 80 V 2 h lang aufgetrennt. Als Größenstandard

DNase-Reaktionspuffer

Tris Base	10 mM
MgCl ₂	10 mM
pH-Wert 7,4 einstellen	

Die verwendete DNase (DNase I, RNase-frei) wurde von Roche Diagnostics, Mannheim, bezogen und wurde vor Anwendung mit DNase-Verdünnungspuffer 1:10 verdünnt.

Reaktionsansatz:

totRNA	2 µg
DNase-Reaktionspuffer	2 µl
DNase I (1:10 verdünnt)	2 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Durchführung:

Der Reaktionsansatz wurde auf Eis pipettiert, 15 min bei 37°C und zum Abstoppen der Reaktion 10 min bei 75°C inkubiert.

2.9.1.2 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription erfolgte mit 10 µl Reaktionsansatz wie unter 2.8.1 beschrieben, allerdings wurden nicht Oligo(dT)₁₅ Primer eingesetzt, sondern Random Hexamers (Promega, Heidelberg). Dies sind 6 bp lange Oligonukleotide, die rein zufällig an alle Arten von RNA (mRNA, rRNA, tRNA) binden und nicht wie die Oligo(dT)₁₅ Primer spezifisch den polyA-Schwanz der mRNA erkennen. Die Verwendung von Random Hexamers ist unbedingt notwendig, wenn man rRNA, wie z.B. 18S, zur Standardisierung verwendet. Außerdem kommt es gerade bei sehr langen RNA-Sequenzen bei Oligo(dT)₁₅ Primern zu einer Anhäufung von Transkripten des 3'-Endes, während am 5'-Ende weniger stark transkribiert wird.

2.9.1.3 Real-Time PCR**Verwendete Primer:**

Die Primer wurden mit der PrimerExpress[®] Software v2.0 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) nach den für die Real-Time PCR geltenden Richtlinien ausgewählt.

Alle Oligonukleotide wurden von PE Applied Biosystems, Weiterstadt bezogen. Die Primer für die GAPDH-PCR basieren auf der für die Ratte bekannten Sequenz der GAPDH mRNA (Tso *et al.*, 1985). Das Amplifikationsprodukt ist 101 bp lang.

Die Mengen an eingesetzter cDNA wurden auf die 18S Untereinheit der ribosomalen RNA als Housekeeping Gene standardisiert. Die Primersequenzen hierfür basieren auf der für die Ratte bekannten 18S rRNA-Sequenz (Torczynski *et al.*, 1983). Das Amplifikationsprodukt hat ebenfalls eine Länge von 101 bp.

GAPDH Ratte Sense Primer:

5'-TTC AAT GGC ACA GTC AAG GC-3'

GAPDH Ratte Antisense Primer:

5'-TCA CCC CAT TTG ATG TTA GCG-3'

18SrRNA Sense Primer:

5'-TTC GGA ACT GAG GCC ATG AT-3'

18SrRNA Antisense Primer:

5'-TTT CGC TCT GGT CCG TCT TG-3'

Durchführung:

Alle benötigten Reagenzien sowie das für die Real-Time PCR verwendete Gerät (ABI PRISM 7700 Sequence Detector) wurden von PE Applied Biosystems, Weiterstadt, bezogen. SYBR[®] Green 1 Farbstoff wird nicht einzeln zum Reaktionsansatz pipettiert, sondern ist im 10 x SYBR[®] Green Puffer enthalten. Für die PCR wurden unterschiedliche cDNA-Verdünnungen verwendet (1:40 für GAPDH, 1:2560 für 18S).

Reaktionsansatz (25 µl):

cDNA-Verdünnung	2 µl
10 x SYBR [®] Green PCR Puffer	1 x
dATP/dCTP/dGTP	200 µM
dUTP	400 µM
MgCl ₂	3 mM
Primer	je 4 pmol
AmpErase Uracil N-Glykosylase	0,25 U
AmpliTaQ Gold DNA-Polymerase	0,6125 U

Der Reaktionsansatz wurde zunächst 2 min bei 50°C erhitzt. Dies führt zu einer Aktivierung der AmpErase Uracil N-Glykosylase, die einzel- und doppelsträngige uracilhaltige DNA durch Hydrolyse der glykosidischen Bindung des Uracil an das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA abbaut. Vor Beginn der eigentlichen DNA-Amplifizierung wird so eine mögliche Kontamination mit uracilhaltiger DNA aus vorangegangenen PCR-Reaktionen entfernt. Danach wird 10 min bei 95°C erhitzt, um die AmpliTaq Gold Polymerase zu aktivieren. Dies ist ein sog. Hot Start Enzym, d.h. es amplifiziert nur bei einer Temperatur von 95°C, wodurch die Synthese von nicht spezifischen Produkten unterdrückt wird. Es folgen 40 Zyklen mit 15 sec bei 95°C (Denaturierung) und 1 min bei 62°C (Anlagerung der Primer).

Pro cDNA wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Außerdem wurde für GAPDH und für 18S jeweils eine Eichgerade aus vier Verdünnungen gepoolter cDNA erstellt und Kontrollen ohne cDNA (NTC= no template control) verwendet, um auf Kontaminationen zu prüfen.

2.9.2 PCR MIT TAQMAN[®] SONDE

Alle Reagenzien und Oligonukleotide sowie das Gerät für die Real-Time PCR (ABI PRISM 5700 Sequence Detector) wurden von PE Applied Biosystems, Weiterstadt, bezogen.

2.9.2.1 Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription wurde die mit dem RNeasy[®] Mini Kit gewonnene RNA (siehe 2.7.1.2) eingesetzt.

Reaktionsansatz (100 µl):

totRNA	2 µg
TaqMan RT Puffer	1 x
MgCl ₂	5,5 mM
dNTP-Mix	500 µM
Random Hexamers	2,5 µM
RNase-Inhibitor	0,4 U/µl
MultiScribe Reverse Transkriptase	1,25 U/µl

Der Reaktionsansatz wurde in einem Thermocycler (Gene Amp PCR System 9700, PE Applied Biosystems, Weiterstadt) zunächst 10 min bei 25°C, dann 30 min bei 48°C und zum Abstoppen der Reaktion 5 min bei 95°C erhitzt.

2.9.2.2 Real-Time PCR

Die Primer und die TaqMan[®] Sonde für GAPDH wurden basierend auf der Sequenz der GAPDH mRNA aus der Ratte (Tso *et al.*, 1985) mit der PrimerExpress[®] Software v2.0 nach den für die Real-Time geltenden Richtlinien ausgesucht. Das Amplifikationsprodukt ist 74 bp lang.

GAPDH Ratte Sense Primer:

5'-GGC ACA GTC AAG GCT GAG AAT-3'

GAPDH Ratte Antisense Primer:

5'-GGA TCG CGC TCC TGG AA-3'

GAPDH TaqMan[®] Sonde:

5'-AGC TGG TCA TCA ATG GGA AAC CCA TCA-3'

Zur Standardisierung auf 18S wurde ein von PE Applied Biosystems entwickelter Assay nach Angaben des Herstellers eingesetzt [18S Ribosomal RNA PDAR (Pre-Developed TaqMan[®] Assay Reagents)].

Durchführung:

Reaktionsansatz (50 µl):

cDNA (1:8-Verdünnung)	1,5 µl
2 x TaqMan [®] Universal MasterMix Puffer	1 x
Primer	je 900 nM
TaqMan [®] Sonde	250 nM

1 x TaqMan[®] Universal MasterMix enthält 5,5 mM MgCl₂, je 200 µM dA/C/GTP, 400 µM dUTP, AmpErase UNG 0,01 U/µl und AmpliTaq Gold DNA-Polymerase 0,025 U/µl.

Die Durchführung der PCR erfolgte wie unter 2.9.1.3 beschrieben.

2.10 ANREICHERUNG VON PROTEINEN MITTELS IMMUNPRÄZIPITATION

Zur Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von IRP-1 wurden zunächst Homogenate aus Rattenlebern hergestellt, aus denen IRP-1 mit einem spezifischen Antikörper immunpräzipitiert wurde, um es selektiv anzureichern. Anschließend wurde das Präzipitat mittels Western Blot mit einem Phosphoserin-Antikörper näher untersucht, um so genaueren Aufschluss über die Phosphorylierung von IRP-1 zu erhalten.

2.10.1 PROBENVORBEREITUNG

2.10.1.1 Lösungen

Lysepuffer

Tris	25 mM
NaCl	150 mM
Deoxycholat	0,5% (m/V)
Nonidet P-40	1% (V/V)

Kurz vor Gebrauch wurden dem Lysepuffer die Protease-Inhibitoren PMSF (Endkonzentration 1 mM, gelöst in Isopropanol) und Complete[®] (Roche Diagnostics, Mannheim, 40 µl pro ml Lysepuffer), die Phosphatase-Inhibitoren Natriumfluorid (50 mM) und Natriumorthovanadat (1 mM) sowie DTT (1 mM) zugesetzt.

2.10.1.2 Herstellung von Proteinextrakten aus Rattenlebern

Die Herstellung von Proteinextrakten aus Rattenlebern erfolgte analog 2.6.1.2. Für die nachfolgende Immunpräzipitation wurden die erhaltenen Homogenate unverdünnt eingesetzt.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Lowry-Methode (siehe 2.6.2).

2.10.2 IMMUNPRÄZIPITATION

Bei der Immunpräzipitation kann man gewünschte Proteine durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion und anschließende Abtrennung des gebildeten Komplexes gezielt detektieren und quantifizieren. Dazu wurden die Rattenleberhomogenate zunächst mit einem polyklonalen spezifischen IRP-1 Antikörper aus dem Hasen, der uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr.

Matthias W. Hentze, EMBL Heidelberg zur Verfügung gestellt wurde, inkubiert. Danach wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe durch Inkubation mit rekombinantem Protein A (Sigma, Taufkirchen) abgetrennt. Protein A ist ein Zellwandbestandteil aus dem Bakterium *Staphylokokkus aureus*, das an Immunglobuline binden kann. Dabei wird die Bindung an das Antigen nicht beeinflusst. Außerdem wird es für Immunpräzipitationen in einer an Agarose-Kügelchen gebundenen Form eingesetzt, so dass es durch Zentrifugation sehr leicht abgetrennt werden kann. So konnte im Präzipitat IRP-1 selektiv angereichert werden.

Durchführung:

Die Leberhomogenate wurden mit Lysepuffer zunächst auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt. 500 µl des Homogenats wurden für die Immunpräzipitation eingesetzt und zuerst mit 10 µl des gegen IRP-1 gerichteten Antikörpers versetzt und im Kühlraum bei 4°C über Nacht unter ständigem Rotieren bei 15-30 U/min inkubiert. Danach wurden pro Ansatz 50 µl rekombinantes Protein A zugegeben und weitere 2 h im Kühlraum inkubiert. Die Abtrennung der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte durch anschließende Zentrifugation (1 min, 4°C, 14000 rpm). Das Pellet wurde dreimal mit 500 µl kaltem Lysepuffer gewaschen und dann mit 30 µl Lysepuffer und 20 µl 5 x Probenpuffer (siehe 2.10) versetzt, vorsichtig gemischt und 5 min bei 95°C gekocht. 35 µl des Überstands wurden für den Western Blot eingesetzt.

Um die Spezifität der Immunpräzipitation zu überprüfen, wurde zusätzlich eine Präzipitation mit 10 µl eines aus dem Kaninchen gewonnenen Kontrollserums, das uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Hermann Ammer (Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt wurde, durchgeführt.

2.11 DETEKTION VON PROTEINEN MITTELS WESTERN BLOT

Die Expression von GAPDH, von Ferritin und der Phosphorylierungsstatus von IRP-1 sowie IRP-1 selbst wurden mittels Western Blot untersucht. Dazu wurden zunächst Proteinextrakte aus den entsprechenden Lebern bzw. aus unterschiedlich vorbehandelten Rattenhepatozyten hergestellt. Die Proteine wurden anschließend durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membranen transferiert und immunologisch identifiziert.

Zur Bestimmung des Phosphorylierungsstatus von IRP-1 wurde dieses zunächst mittels Immunpräzipitation angereichert (siehe 2.10), bevor es im Western Blot mit einem Phosphoserin-Antikörper genauer charakterisiert wurde. Um sicherzustellen, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, wurde der Phosphoserin Western Blot nach Ablösung der gebundenen Antikörper (siehe 2.11.3.5) mit dem zur Immunpräzipitation verwendeten Antikörper gegen IRP-1 aus dem Hasen immunologisch detektiert.

2.11.1 PROBENVORBEREITUNG

2.11.1.1 Lösungen

Lysepuffer für die Detektion von GAPDH

Tris-HCl	50 mM
NaCl	200 mM
Triton-X 100	0,1% (V/V)
pH-Wert 7,4 einstellen	

Lysepuffer für die Detektion von Ferritin

Tris-HCl	5 mM
KCl	40 mM
Triton-X 100	1% (V/V)
pH-Wert 7,4 einstellen	

Kurz vor Gebrauch wurden dem Lysepuffer der Protease-Inhibitor PMSF (gelöst in Isopropanol, Endkonzentration 0,1 mM) und der Protease-Inhibitor Mix Complete® (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers zugesetzt.

Lysepuffer für die Detektion von Phosphoserin

siehe 2.10.1

5 x Probenpuffer

3,125 M Tris-HCl pH 6,8	100 µl
Glycerin	500 µl
20% (m/V) SDS	250 µl
16% (m/V) DTT	125 µl
5% (m/V) Pyronin	5 µl
H ₂ O	20 µl

2.11.1.2 Herstellung von Proteinextrakten aus Rattenlebern

Die Herstellung von Proteinextrakten aus Rattenlebern erfolgte analog 2.6.1.2. Zur Untersuchung der Ferritinexpression wurde das erhaltene Homogenat allerdings direkt für den Western Blot eingesetzt, nicht wie sonst üblich die 1:10 Verdünnung.

2.11.1.3 Herstellung von Proteinextrakten aus Rattenhepatozyten

Die Proteinextrakte aus Rattenhepatozyten wurden wie unter 2.6.1.3 beschrieben hergestellt. Beim Western Blot wurden sie lediglich zur Bestimmung der Ferritin-Expression eingesetzt.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Lowry-Methode (siehe 2.6.2).

2.11.1.4 Vorbereitung der Proben für die Elektrophorese**Vorbereitung der Proben für die Detektion von GAPDH:**

2-10 µg Proteinextrakt wurden mit H₂O auf das gleiche Volumen aufgefüllt und anschließend mit 5 x Probenpuffer (Endkonzentration 1 x) versetzt und 5 min bei 95°C gekocht.

Vorbereitung der Proben für die Detektion von Ferritin:

400 µg (Rattenleber) bzw. 100 µg (Rattenhepatozyten) Protein wurden mit H₂O auf 40 µl aufgefüllt und 10 min bei 70°C erhitzt. Dabei wird der Großteil der Proteine denaturiert und kann durch anschließende Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, 4°C) abgetrennt werden. Ferritin dagegen ist hitzebeständig, verbleibt also im Überstand und kann dort angereichert werden. Vom klaren Überstand wurden bei den Proteinextrakten aus den Rattenlebern 10 µl mit 10 µl Lysepuffer verdünnt und mit 5 µl 5 x Probenpuffer bei 95°C gekocht. 20 µl wurden für die Elektrophorese eingesetzt.

Zur Untersuchung der Ferritinexpression in den Rattenhepatozyten wurden 32 μl der Extrakte mit 8 μl 5 x Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C gekocht. 35 μl wurden auf das Gel aufgetragen.

Als Positivkontrolle wurde 1 μl Ferritin aus der humanen Leber (Calbiochem, Schwalbach) mit 79 μl H₂O verdünnt und mit 20 μl 5 x Probenpuffer bei 95°C gekocht. 20 μl dieser Mischung wurden für die Elektrophorese eingesetzt.

Vorbereitung der Proben für die Detektion von Phosphoserin/IRP-1:

siehe 2.10

2.11.2 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970). Durch das Kochen der Proben mit dem Probenpuffer werden die Proteine denaturiert. Außerdem lagert sich das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) um die Proteine herum an, so dass diese nach außen hin konstant negativ geladen vorliegen. Das Laufverhalten bei der anschließenden Elektrophorese wird daher nur durch die Größe der Proteine beeinflusst.

2.11.2.1 Lösungen

Zur Herstellung von Polyacrylamid-Gelen wurde eine Polycrylamid/Bisacrylamid Stammlösung (Rotiphorese Gel 30) der Firma Roth (Karlsruhe) verwendet.

Trenngele (siehe Tabelle 2.2):

Tabelle 2.2: Zusammensetzung der Trenngele

Substanzen	7,5%	10%	15%
30% PAA-Lösung	5 ml	6,25 ml	10 ml
1,5 M Tris pH 8,8	5 ml	4,69 ml	5 ml
10% (m/V) SDS	0,2 ml	0,188 ml	0,2 ml
H ₂ O	9,8 ml	7,625 ml	4,8 ml
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	20 μl	18,8 μl	20 μl
APS (10%) (Ammoniumperoxodisulfat)	100 μl	93,8 μl	100 μl

Sammelgel

30% PAA-Lösung	2,125 ml
1,25 M Tris pH 6,8	1,25 ml
10% (m/V) SDS	0,125 ml
H ₂ O	8,75 ml
TEMED	25 µl
APS (10%)	125 µl

Zunächst wurden die ersten drei Bestandteile gemischt und 10 min mit einer Vakuumpumpe entgast, um anaerobe Bedingungen für die Polymerisation zu erhalten, dann wurden TEMED (Vernetzer) und APS (Polymerisationsstarter) zugegeben.

Elektrophoresepuffer

Tris	3 g
Glycin	14,4 g
SDS	1 g
H ₂ O	ad 1000 ml

2.11.2.2 Durchführung

Die Auftrennung der Proteinextrakte erfolgte auf 1,5 mm dicken, denaturierenden Polyacrylamid-Gelen in einer Mini-Gel Apparatur von BioRad (Mini Protean II, München). Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins wurden Gele unterschiedlichen PAA-Gehalts verwendet (Phosphoserin und IRP-1 7,5%, GAPDH 10%, Ferritin 15%). Die Gelapparatur wurde zusammengebaut und das Trenngel bis etwa 2 cm unter den oberen Rand zwischen die Glasplatten gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach 20 min wurde das Wasser mit einer Spritze abgesaugt, das Sammelgel eingefüllt und die Probenkämme eingesetzt. Das Gel wurde über Nacht in feuchte Tücher eingewickelt bei 4°C gelagert, um vollständig polymerisieren zu können.

Am nächsten Tag wurden entsprechende Volumina der Proben in die Taschen gefüllt.

Nach dem Sammellauf (100 V, 21 min) wurden die Proteine bei 200 V 30-45 min aufgetrennt (Netzanschlussgerät: Biometra, Göttingen). Zur Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine wurden kommerziell erhältliche Marker eingesetzt (Molecular Weight Standard sc-2035, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg; HRP Protein Marker Detection Pack, Cell Signaling, Frankfurt/Main).

2.11.3 IMMUNOLOGISCHE DETEKTION VON PROTEINEN DURCH WESTERN BLOT

Nach Auftrennung der Proteinextrakte mittels SDS-PAGE wurden diese elektrophoretisch auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon-P, 0,45 µm Porengröße, Millipore, Bedford, MA, USA) transferiert. Um das zu untersuchende Protein detektieren zu können, wurde der Blot zunächst mit der Lösung eines primären Antikörpers inkubiert, der spezifisch an das gesuchte Protein bindet. Die Detektion erfolgte anschließend durch Zugabe eines zweiten Anti-Immunglobulin-Antikörpers, an den eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Der Komplex aus erstem und zweitem Antikörper wurde durch Zugabe einer Luminol-Lösung (Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus, NEN Life Science Products, Köln) identifiziert: Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol in Gegenwart von H₂O₂. Dabei wird Licht der Wellenlänge 428 nm frei, dessen Intensität durch ebenfalls zugesetzte chemische Verstärker erhöht werden kann. Die Chemolumineszenz konnte dann an einer Kodak Image Station (Eastman Kodak Company, Rocester, NY, USA) detektiert und densitometrisch ausgewertet werden. Alternativ erfolgte eine Detektion durch Auflegen eines Films (Fuji Medical XRay Film, Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf).

2.11.3.1 Lösungen

Anodenpuffer I

Tris	15 g
Methanol	100 ml
H ₂ O	400 ml

Anodenpuffer II

Tris	1,5 g
Methanol	100 ml
H ₂ O	400 ml

Kathodenpuffer

ε-Amino-n-capronsäure	2,6 g
Methanol	100 ml
H ₂ O	400 ml

TBS-T (Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween)

Tris	3 g
NaCl	11,1 g
Tween 20	1 ml
H ₂ O	ad 1000 ml

pH-Wert 8,0 einstellen

2.11.3.2 Proteintransfer durch Semidry-Blotting

Der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte mit einer Semidry-Apparatur (Fastblot B43, Biometra, Göttingen). Sie besteht aus zwei Plattenelektroden aus Graphit, zwischen denen ein Blotsandwich aus Filterpapieren, Gelen und Membran horizontal eingebaut wird. Sie wurde erstmals 1984 von Kyhse-Andersen beschrieben (Kyhse-Andersen, 1984). Beim Elektroblothing werden nun bei konstanter Stromstärke die Proteine aus der Polyacrylamidmatrix über das senkrecht zum Gel angelegte elektrische Feld eluiert und auf die Membran transferiert. Das diskontinuierliche Puffersystem sorgt für einen gleichmäßigen und effektiven Proteintransfer.

Durchführung:

Die PVDF-Membran wurde auf die Größe zweier Trenngele zugeschnitten und zuerst 5 min in Methanol und anschließend in Wasser geschüttelt. Auf die Anode wurden sechs ebenfalls zugeschnittene Filterpapiere (Novablot, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), die kurz in Anodenpuffer I getaucht worden waren, übereinander gelegt. Luftblasen wurden mit Hilfe einer kleinen Walze entfernt. Danach wurden drei mit Anodenpuffer II getränkte Filterpapiere aufgewalzt. Auf diese Schicht an Filterpapieren wurde zuerst die mit Anodenpuffer II benetzte Membran und dann zwei Gele aufgelegt, die anschließend mit neun in Kathodenpuffer getauchten Filterpapieren bedeckt wurden.

Das Elektroblothing wurde 1 h bei 64 mA (0,8 mA pro cm² zu blottende Membranfläche) durchgeführt. Anschließend wurde die Membran 30 min bei 80°C getrocknet.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermindern, wurde die Membran anschließend etwa 1,5 h mit einer Magermilchpulver-Lösung geblockt (5% Blotto, BioRad, München, gelöst in TBS-T pH 8,0). Für den Phosphoserin Western Blot zur Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von IRP-1 wurde ein anderes Blocking Reagenz eingesetzt, da Phosphoserin-Antikörper mit dem Magermilchpulver interagieren können. Eingesetzt wurde eine Lösung aus 5% (m/V) BSA, 1% (m/V) PVP, 1% (m/V) PEG, 0,1% (m/V) Tween 20,

gelöst in 2 x PBS. Für die Detektion von IRP-1 wurde 3% BSA in TBS-T pH 8,0 als Blocking Reagenz verwendet.

2.11.3.3 Verwendete Antikörper

Die Antikörper wurden vor Anwendung jeweils wie angegeben verdünnt. Als Verdünnungslösung diente bei den Antikörpern gegen GAPDH und Ferritin eine Lösung aus 1% Blotto in TBS-T pH 8,0. Die Antikörper für den Phosphoserin Western Blot wurden in dem Blocking Reagenz, das speziell beim Phosphoserin Western Blot eingesetzt wurde (siehe oben), verdünnt. Der Antikörper für den IRP-1 Western Blot wurde in 0,5% BSA in TBS-T pH 8,0 verdünnt.

GAPDH Western Blot:

Die Expression von GAPDH wurde mit einem monoklonalen GAPDH Antikörper aus der Maus (Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA) bestimmt (1:500-Verdünnung). Als sekundärer Antikörper wurde ein Meerrettich-Peroxidase gekoppelter, gegen IgG1 der Maus gerichteter Antikörper aus der Ziege verwendet (Biozol Diagnostika Vertrieb GmbH, Eching), der bei Anwendung 1:1000 verdünnt wurde.

Ferritin Western Blot:

Als primärer Antikörper diente ein polyklonales, gegen Ferritin gerichtetes Antiserum aus dem Hasen (Sigma, Taufkirchen). Dieses wurde in einer 1:1000-Verdünnung eingesetzt. Der sekundäre Antikörper, ein gegen IgG des Hasen gerichteter, Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper, wurde von Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA) bezogen (1:10000 Verdünnung).

Phosphoserin Western Blot:

Der Phosphorylierungsstatus von IRP-1 wurde mit Hilfe eines monoklonalen gegen Phosphoserin gerichteten Antikörpers aus der Maus (Sigma, Taufkirchen) untersucht, der 1:10000 verdünnt eingesetzt wurde. Als sekundärer Antikörper diente ein Meerrettich-Peroxidase gekoppelter, gegen IgG1 der Maus gerichteter Antikörper aus der Ziege (Biozol Diagnostika Vertrieb GmbH, Eching; 1:10000 Verdünnung).

IRP-1 Western Blot:

Zur Detektion von IRP-1 wurde ein spezifischer gegen IRP-1 gerichteter Antikörper (siehe 2.10) in einer Verdünnung von 1:500 verwendet. Als sekundärer Antikörper diente ein gegen IgG des Hasen gerichteter, Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA, 1:10000 Verdünnung).

2.11.3.4 Inkubation mit Antikörpern und Detektion

Die Membran wurde 1 h bei Raumtemperatur (Phosphoserin, IRP-1) oder über Nacht bei 4°C (GAPDH, Ferritin) mit der entsprechenden Verdünnung des primären Antikörpers unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran 5 x 5 min mit TBS-T pH 8,0 gewaschen und 1 h mit dem sekundären Antikörper leicht geschüttelt.

Zur Sichtbarmachung der zu untersuchenden Banden wurden die beiden Detektionslösungen (Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus, NEN Life Science Products, Köln) nach Angaben des Herstellers 1:1 gemischt und die Membran darin 1 min inkubiert. Das Lichtsignal konnte dann an einer Kodak Image Station (Eastman Kodak Company, Rocester, NY, USA) aufgenommen werden.

Beim Phosphoserin Western Blot wurde aufgrund der schwachen Signalintensität eine empfindlichere Methode der Detektion angewendet (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Die Detektionslösungen wurden nach Angaben des Herstellers 40:1 gemischt und die Membran wiederum 1 min inkubiert. Anschließend wurde in der Dunkelkammer ein Film aufgelegt (Fuji Medical XRay Film, Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf) und in einem Curix 60 Processor (Agfa-Gevaert AG, München) entwickelt.

2.11.3.5 Ablösung von gebundenen Antikörpern und erneute Detektion

Zur Überprüfung, ob IRP-1 gleichmäßig immunpräzipitiert worden war, wurde die Membran, auf der Phosphoserin bereits detektiert worden war, mit einem 2-Mercaptoethanol-haltigen Stripping-Puffer (siehe unten) zunächst 30 min bei 50°C unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend 6 x 5 min mit TBS-T pH 8,0 gewaschen. Auf diese Weise wurden die gebundenen Antikörper entfernt und der Blot konnte dann nach erneutem Blocken der Membran mit dem IRP-1 Antikörper inkubiert und anschließend detektiert werden.

Stripping-Puffer :

6,25 mM Tris-HCl pH 6,8	50 µl
2% (m/V) SDS	500 µl
100 mM 2-Mercaptoethanol	200 µl
H ₂ O	ad 25 ml

2.11.4 COOMASSIE BLAU-FÄRBUNG

Zur Überprüfung, ob gleiche Proteinmengen auf das Gel aufgetragen wurden und ob der Transfer auf die PVDF-Membran gleichmäßig erfolgt ist, wurden die Gele nach dem Blotten mit Coomassie Blau Lösung angefärbt. Diese Lösung färbt Proteine jeglicher Art an und macht diese als blaue Banden sichtbar.

2.11.4.1 Lösungen**Coomassie Blau Färbelösung:**

Brilliantblau	0,75 g
Eisessig	25 ml
Ethanol abs.	112,5 ml
H ₂ O	ad 250 ml

Entfärbelösung:

Eisessig	100 ml
Ethanol abs.	333 ml
H ₂ O ad	1000 ml

2.11.4.2 Durchführung

Die SDS-PAGE Gele wurden nach dem Blotten 15 min in der Coomassie Blau Färbelösung geschüttelt und anschließend mehrmals mit Entfärbelösung behandelt, bis die Proteine gut als blau gefärbte Banden sichtbar wurden.

2.12 NACHWEIS VON MATRIX METALLOPROTEINASEN MITTELS ZYMOGRAPHIE

Der Nachweis der Matrix Metalloproteinasen (MMPs) erfolgte wie unter 2.1.3.1 beschrieben aus den ersten Millilitern an Eluat, die nach 24 h kalter Ischämie aus den Lebern ausgespült und gesammelt wurden. Die MMPs wurden aufgrund ihrer Fähigkeit, Gelatine abzubauen, mittels Zymographie (Kleiner und Stetler-Stevenson, 1994) detektiert. Bei dieser Methode werden die Eluate auf Polyacrylamidgelen, die zusätzlich Gelatine Typ A (Sigma, Taufkirchen, 1 mg/ml) enthalten, unter denaturierenden aber nicht-reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Nach abgeschlossener Elektrophorese werden die Proteine durch Waschen mit Triton X-100 wieder renaturiert und 36 h in einem Ca^{2+} - und Zn^{2+} -haltigen Enzympuffer bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit wird an den Stellen, an denen MMPs anwesend sind, die Gelatine verdaut. Bei nachfolgender Färbung der Gele mit Coomassie Blau werden diese Zonen als weiße Banden sichtbar. Sowohl die aktiven als auch die latenten Formen der Enzyme können mit dieser Methode nachgewiesen werden, da die beiden Formen ein unterschiedliches Molekulargewicht aufweisen. Die latenten Formen werden vermutlich durch den Prozess der Denaturierung mit anschließender Renaturierung aktiviert (Kleiner und Stetler-Stevenson, 1994).

Um zu überprüfen, ob die Gelatine spezifisch von MMPs abgebaut wurde, wurden die Gele in Enzympuffer, dem 10 mM EDTA zugesetzt wurde, inkubiert. EDTA fängt Ca^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen ab und inhibiert somit Metalloproteinasen.

Zur Unterscheidung zwischen latenten und aktiven Formen wurden die Lebereluate vor der Elektrophorese in Anwesenheit von 4-Aminophenylquecksilberacetat (APMA) 1 h bei 37°C inkubiert. APMA aktiviert die MMPs durch Spaltung der inaktiven Vorstufen.

2.12.1 LÖSUNGEN

5 x Probenpuffer

Tris-HCl	0,25 M
Glycerin	10% (V/V)
SDS	5% (m/V)
Bromphenolblau	0,05% (m/V)
pH-Wert 6,8 einstellen	

10% SDS-Polyacrylamidgele

siehe 2.11.2

Zum Trenngel wurden 20 mg Gelatine Typ A zugeben und vor dem Entgasen unter leichtem Erwärmen aufgelöst.

Elektrophoresepuffer

siehe 2.11.2.1

Enzypuffer

Tris	5 mM
NaCl	20 mM
CaCl ₂	0,5 mM
ZnCl ₂	1 µM
NaN ₃	0,002% (m/V)

Waschpuffer

Triton-X 100	2,5% (V/V)
--------------	------------

Coomassie Blau Färbelösung/Entfärbelösung

Siehe 2.11.4.1

2.12.2 DURCHFÜHRUNG

Gleiche Volumina der Eluate wurden mit 5 x Probenpuffer versetzt (Endkonzentration 1 x), auf 10% PAA-Gele aufgetragen und im Kühlraum bei 4°C und 40 V über Nacht elektrophoretisch aufgetrennt (Netzanschlussgerät: PowerPac 300, BioRad, München). Anschließend wurden die Gele 3 x 20 min mit Waschpuffer gewaschen und 2 x 20 min in Enzypuffer geschwenkt. Danach wurden die Gele mit Enzypuffer 36 h im Wasserbad bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Enzypuffer wurde nach 18 h erneuert. Nach der Inkubation wurden die Gele wie unter 2.11.3 beschrieben mit Coomassie Blau angefärbt und eingescannt (Epson Expression 1680 Pro, Epson, Chatswood, NSW, Australien).

2.13 STATISTIK

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism, Version 3.02, GraphPad Software Inc., San Diego, USA. Es sind jeweils die Mittelwerte und die SEM angegeben. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit dem one sample t-test oder mit dem student's t-test ermittelt. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

3 ERGEBNISSE

3.1 EINFLUSS VON ANP AUF DIE AKTIVITÄT VON MATRIX METALLOPROTEINASEN

Beim Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber kann es nach der Ischämiephase zu einer Ablösung der sinusoidalen Endothelzellen von der sie umgebenden Matrix kommen, was zur Organdysfunktion und auch zum Organversagen erheblich beitragen kann. An diesem Vorgang sind Matrix Metalloproteinasen (MMPs) maßgeblich beteiligt (Upadhy *et al.*, 1997).

Um die Sekretion und Aktivierung von MMPs nach kalter Ischämie in den isoliert perfundierten Rattenlebern untersuchen und Aussagen über eine mögliche Beeinflussung der MMP-Aktivität durch ANP machen zu können, wurden die nach 24 h Ischämie aus den Lebern ausgespülten Eluate mittels Zymographie (siehe „Material und Methoden“) untersucht.

3.1.1 NACHWEIS DER ANWESENHEIT VON MMPs

Die Zymographie der Eluate aus den Lebern der Kontrollgruppe (Ko) zeigte deutlich die Anwesenheit mehrerer Matrix Metalloproteinasen nach 24 h kalter Ischämie. Nach Inkubation der Gele in Enzympuffer, dem der Metalloproteinasen-Inhibitor EDTA (Ethyldiamin-tetraessigsäure) zugesetzt worden war, konnte keine gelatinolytische Aktivität mehr nachgewiesen werden (**Bild 3.1**).

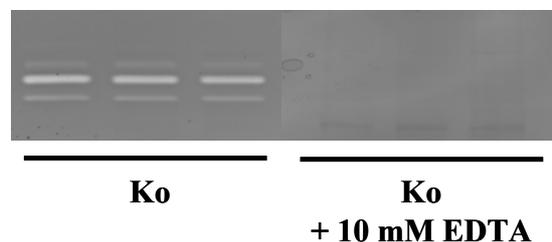


Bild 3.1: *Anwesenheit von MMPs nach 24 h kalter Ischämie*

Lebern männlicher Sprague-Dawley Ratten wurden 30 min perfundiert und 24 h bei 4°C in UW-Lösung gelagert. Bei der anschließenden Reperfusion mit KH-Puffer wurden die ersten Milliliter an Eluat gesammelt und die Eluate der unbehandelten Kontrollgruppe (Ko) wie unter „Material und Methoden“ beschrieben mittels Zymographie auf die Anwesenheit von MMPs untersucht. Ein repräsentatives Gel aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit n=3 ist abgebildet.

3.1.2 EINFLUSS VON ANP AUF MMPs

Nachdem gezeigt worden war, dass in unserem Modell der kalten Ischämie und Reperfusion MMPs nach der Ischämiephase in den Extrazellularraum sezerniert werden, wurde anschließend überprüft, ob eine Präkonditionierung der Lebern mit ANP (200 nM) die Sekretion bzw. die Aktivität der MMPs beeinflussen kann.

Wie in **Bild 3.2** zu sehen ist, konnte jedoch kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der mit ANP vorbehandelten Gruppe festgestellt werden. Eine Präkonditionierung mit ANP hatte keinen Einfluss auf die Aktivierung von MMPs, da in den Eluaten der ANP-Lebern exakt das gleiche MMP-Muster detektiert werden konnte wie in der Kontrollgruppe. Außerdem zeigte ANP auch keinen Effekt auf die Menge an sezernierten MMPs.

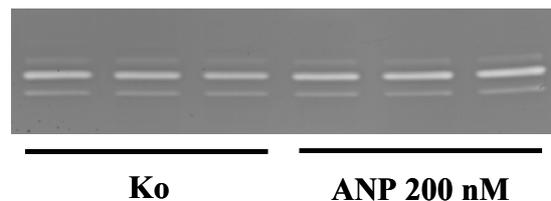


Bild 3.2: *Einfluss der ANP-Präkonditionierung auf MMPs*

Lebern männlicher Sprague-Dawley Ratten wurden 30 min in An- und Abwesenheit von ANP (200 nM) perfundiert und 24 h bei 4°C in UW-Lösung gelagert. Bei der anschließenden Reperfusion wurden sowohl in der Kontrollgruppe (Ko, unbehandelte Tiere) als auch in der mit ANP vorbehandelten Gruppe die ersten Milliliter an Eluat aufgefangen und mittels Zymographie wie unter „Material und Methoden“ beschrieben auf MMPs untersucht. Ein repräsentatives Gel aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit jeweils n=3 ist abgebildet.

Zur Unterscheidung zwischen latenten und aktiven Formen der MMPs wurden die Lebereluate vor der Zymographie mit 1 mM 4-Aminophenylquecksilberacetat (APMA), einem Aktivator von Matrix Metalloproteinasen, inkubiert (**Bild 3.3**). Ein Teil der MMPs wurde gespalten, denn nach Behandlung der Proben mit APMA konnten zwei zusätzliche Banden mit einem kleineren Molekulargewicht nachgewiesen werden. Passend dazu nahm die Intensität von zwei ursprünglich detektierten Banden ab. Die dritte Bande blieb unverändert. Somit konnten also sowohl aktive als auch latente Formen der MMPs in den Eluaten nachgewiesen werden. Aber auch hier waren keine Unterschiede zu den mit ANP vorbehandelten Lebern zu sehen.

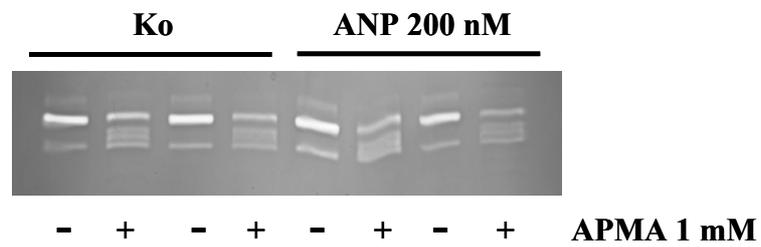


Bild 3.3: *Aktivierung der MMPs mit APMA*

Die Lebern wurden 30 min perfundiert und 24 h bei 4°C in UW-Lösung gelagert. Bei der anschließenden Reperfusion wurden sowohl in der Kontrollgruppe (Ko, unbehandelte Tiere) als auch in der ANP-Gruppe (mit 200 nM ANP präkonditionierte Organe) die ersten Milliliter an Eluat aufgefangen und mittels Zymographie wie unter „Material und Methoden“ beschrieben auf MMPs untersucht. Ein Teil der Proben wurde zur Aktivierung latenter Formen vor der Zymographie mit 1 mM 4-Aminophenylquecksilberacetat (APMA) inkubiert. Ein repräsentatives Gel aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit jeweils n=2 ist abgebildet.

3.2 REGULATION VON EISENREGULIERENDEN PROTEINEN UND FERRITIN

3.2.1 HORMONELLE PRÄKONDITIONIERUNG MIT ANP

Hormonelle Präkonditionierung mit ANP erhöht signifikant die Expression der Hämoxxygenase-1 (HO-1) mRNA (Gerwig *et al.*, 2001, abstract). Um zu untersuchen, ob ANP über eine Induktion von HO-1 die Eisenspiegel der Zelle und in Folge davon die Bindungsaktivität der Eisenregulierenden Proteine (IRPs) und die Synthese des zytoprotektiven Ferritin beeinflussen kann, wurde die RNA-Bindungsaktivität von IRP-1 und die Ferritinsynthese im Verlauf von Ischämie und Reperfusion mit und ohne ANP-Präkonditionierung untersucht.

3.2.1.1 IRP-Bindungsaktivität und Ferritinexpression im Verlauf von kalter Ischämie und Reperfusion

Zunächst wurden die IRP-Bindungsaktivität und die Ferritinexpression im Verlauf von Ischämie und Reperfusion an unbehandelten Kontrollorganen betrachtet. Wie **Bild 3.4 A** zeigt, verminderte sich die RNA-Bindungsaktivität von IRP-1 nach 24 h Ischämie signifikant. Im Verlauf der Reperfusion kam es zu keiner weiteren Veränderung. IRP-2 konnte nicht nachgewiesen werden, da es in der Leber in weitaus geringerem Maße exprimiert wird als IRP-1 (Cairo *et al.*, 2002). Die Ferritinlevel blieben im Verlauf von Ischämie und Reperfusion konstant (**Bild 3.4 B**).

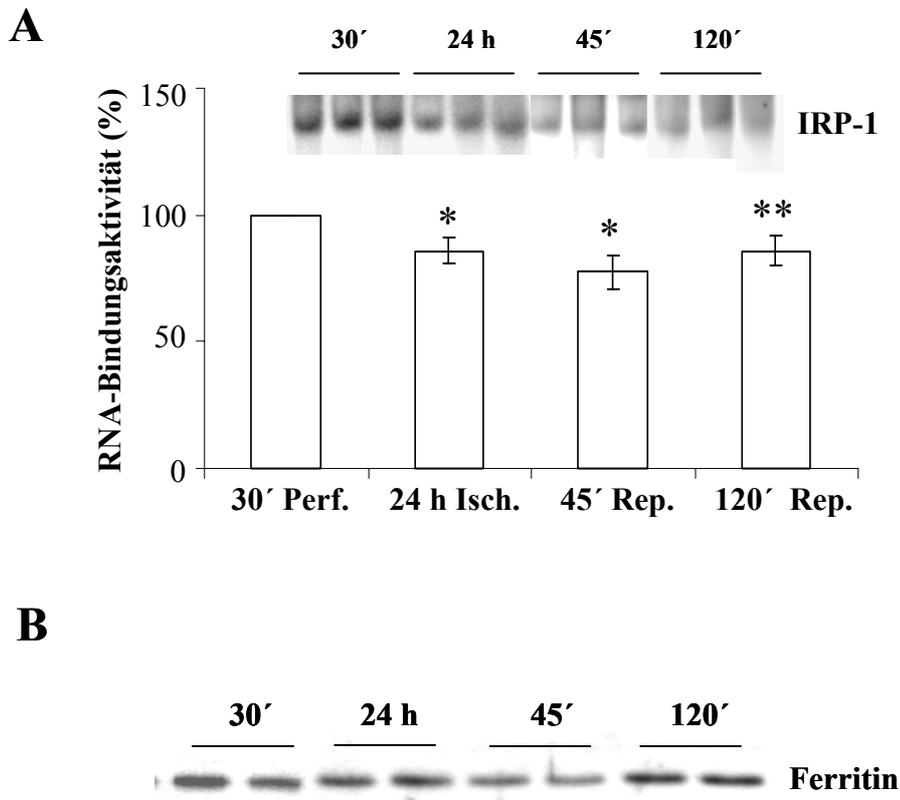


Bild 3.4: *RNA-Bindungsaktivität von IRP-1 und Ferritinexpression im Verlauf von kalter Ischämie und Reperfusion*

Die Lebern wurden 30 min perfundiert, 24 h bei 4°C in UW-Lösung gelagert und anschließend 45 und 120 min reperfundiert. Zur Untersuchung der RNA-Bindungsaktivität (A) wurde nach Herstellung zytoplasmatischer Proteinextrakte (siehe „Material und Methoden“) ein REMSA durchgeführt. Dargestellt ist ein exemplarischer Shift der unbehandelten Kontrollorgane (Ko) und die densitometrische Auswertung aus mind. zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit n=3-4. Aufgetragen sind die Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zum Zeitpunkt 30 min Perfusion (one sample t-test). Zur Untersuchung der Ferritinexpression (B) wurden wie unter „Material und Methoden“ beschrieben Western Blots durchgeführt. Gezeigt ist ein exemplarischer Blot mit n=2.

3.2.1.2 Einfluss von ANP und 8-Br-cGMP auf die IRP-Bindungsaktivität und Ferritinexpression

Eine Präkonditionierung der Lebern mit ANP verminderte deutlich die IRP-1-Bindungsaktivität. Nach 24 h Ischämie verschwand dieser Effekt. In der Reperfusion konnten ebenfalls keine Unterschiede mehr detektiert werden (**Bild 3.5 A**). Um zu überprüfen, ob gleiche Mengen an IRP-1 vorlagen, wurde den Proben zur vollständigen Aktivierung von IRP-1 Mercaptoethanol zugesetzt (**Bild 3.5 B**).

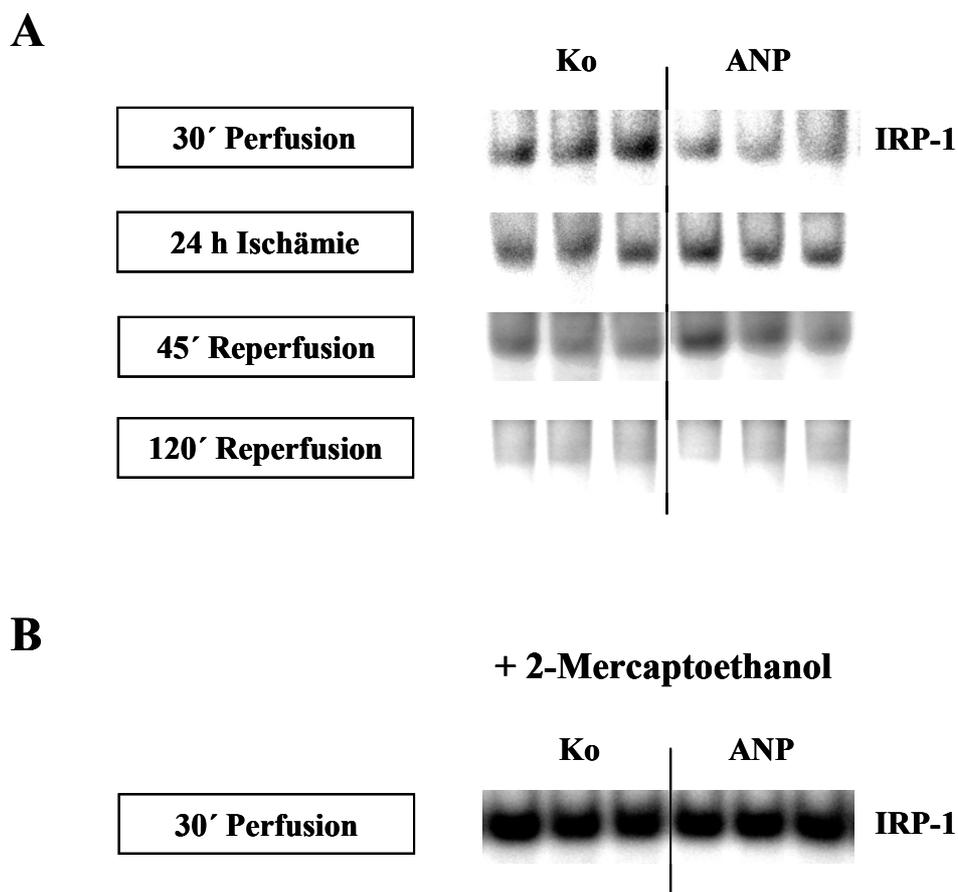
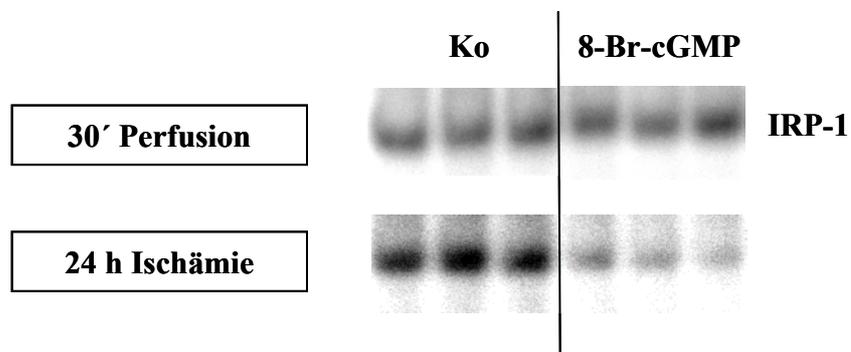


Bild 3.5: Einfluss der ANP-Präkonditionierung auf die IRP-1 Bindungsaktivität

Die Lebern wurden 30 min in An- und Abwesenheit von ANP (200 nM) perfundiert, 24 h bei 4°C in UW-Lösung gelagert und anschließend 45 und 120 min reperfundiert. Nach Herstellung zyttoplasmatischer Proteinextrakte wurde wie unter „Material und Methoden“ beschrieben ein REMSA durchgeführt. **A:** Dargestellt ist pro Zeitpunkt ein exemplarischer Shift aus mind. drei voneinander unabhängigen Experimenten mit n=3-4. Verglichen wurden jeweils unbehandelte Organe (Ko) mit ANP präkonditionierten Organen. **B:** Als Ladungskontrolle wurde den Proben 2-Mercaptoethanol zugesetzt, welches IRP-1 vollständig aktiviert. Gezeigt ist ein exemplarischer Shift von zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit n=3.

Um zu überprüfen, ob die Verminderung der IRP-Bindungsaktivität durch ANP-Präkonditionierung über cGMP vermittelt wird, wurden Perfusionen mit dem cGMP-Analogon 8-Br-cGMP durchgeführt und die IRP-Bindungsaktivität im REMSA untersucht. Wie **Bild 3.6** zeigt, konnte 8-Br-cGMP den mit ANP beobachteten Effekt nach 24 h Ischämie imitieren. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich eine deutliche Verminderung der IRP-1 Bindungsaktivität.

A



B

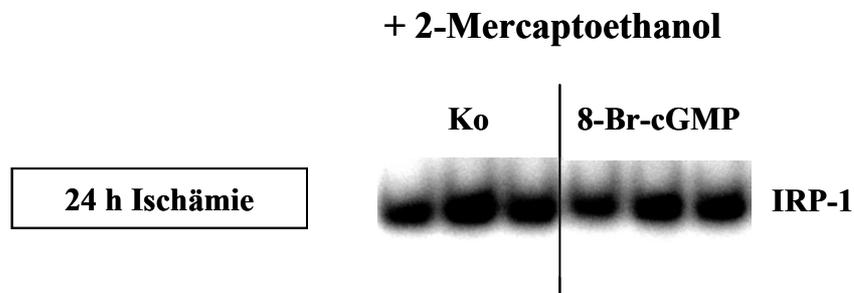
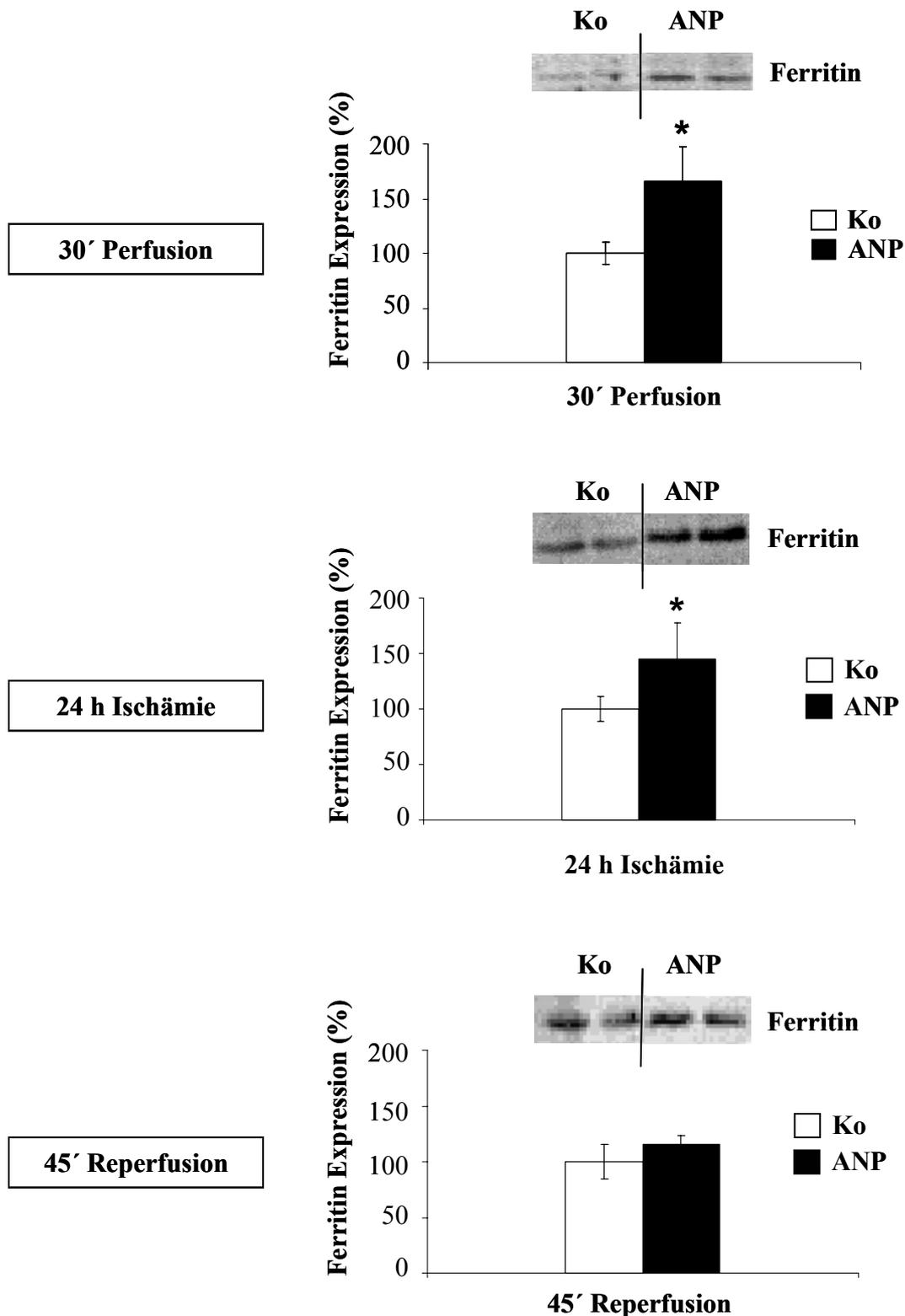


Bild 3.6: *Einfluss von 8-Br-cGMP auf die IRP-1 Bindungsaktivität*

Die Lebern wurden 30 min in An- und Abwesenheit von 8-Br-cGMP (50 μ M) perfundiert und 24 h bei 4°C in UW-Lösung gelagert. Nach Herstellung zytoplasmatischer Proteinextrakte wurde die IRP-1 Bindungsaktivität in unbehandelten Lebern (Ko) mit der in 8-Br-cGMP vorbehandelten Organen mittels REMSA (siehe „Material und Methoden“) verglichen (**A**). Dargestellt ist jeweils ein exemplarischer Shift aus drei voneinander unabhängigen Experimenten mit n=3-4. Zugabe von 2-Mercaptoethanol aktivierte IRP-1 vollständig (**B**). Gezeigt ist ein Shift mit n=3.

Anschließend wurde die Ferritin Expression mittels Western Blot untersucht. In den mit ANP präkonditionierten Lebern war die Ferritinexpression im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollorganen nach 30 min Perfusion und nach 24 h Ischämie erhöht. In der Reperfusion konnten allerdings keine Unterschiede mehr detektiert werden (Bild 3.7)



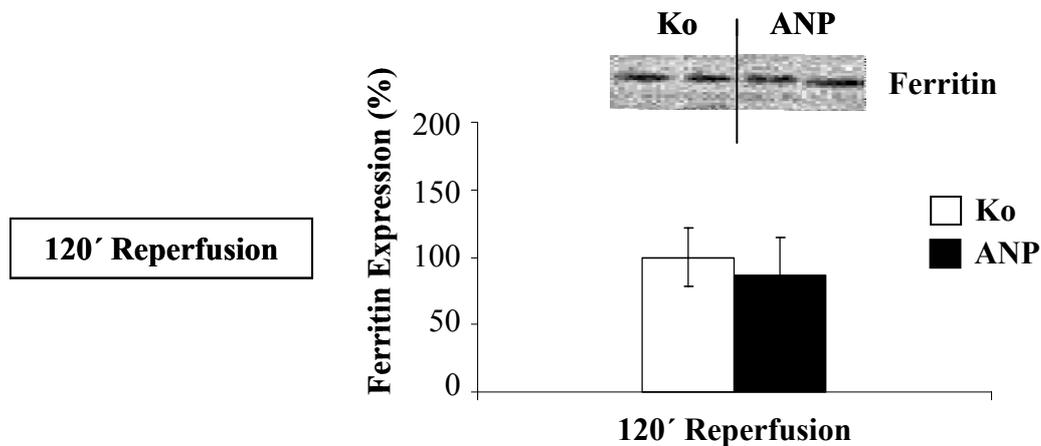


Bild 3.7: Erhöhung der Ferritinexpression durch ANP-Präkonditionierung

Die Lebern wurden in An- und Abwesenheit von ANP (200 nM) 30 min perfundiert, 24 h bei 4°C in UW-Lösung gelagert und 45 bzw. 120 min reperfundiert. Anschließend wurden wie in „Material und Methoden“ beschrieben Proteinextrakte hergestellt und ein Ferritin Western Blot durchgeführt. Verglichen wurde die Ferritinexpression zwischen unbehandelten Kontroll-Lebern (Ko) und ANP-präkonditionierten Organen (ANP). Dargestellt ist jeweils ein exemplarischer Western Blot und die densitometrische Auswertung aus mind. zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit n=4-5. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM. *p<0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet (one sample t-test).

3.2.1.3 Versuche an isolierten Rattenhepatozyten

Um die zelluläre Lokalisation der mit ANP gesehenen Effekte zu bestimmen, wurde sowohl die IRP-1 Bindungsaktivität (**Bild 3.8 A**) als auch die Ferritinexpression (**Bild 3.8 B**) in unbehandelten und mit ANP (200 nM) vorbehandelten isolierten Rattenhepatozyten untersucht.

Durch ANP wurde weder die IRP-Bindungsaktivität vermindert noch die Ferritinexpression erhöht.

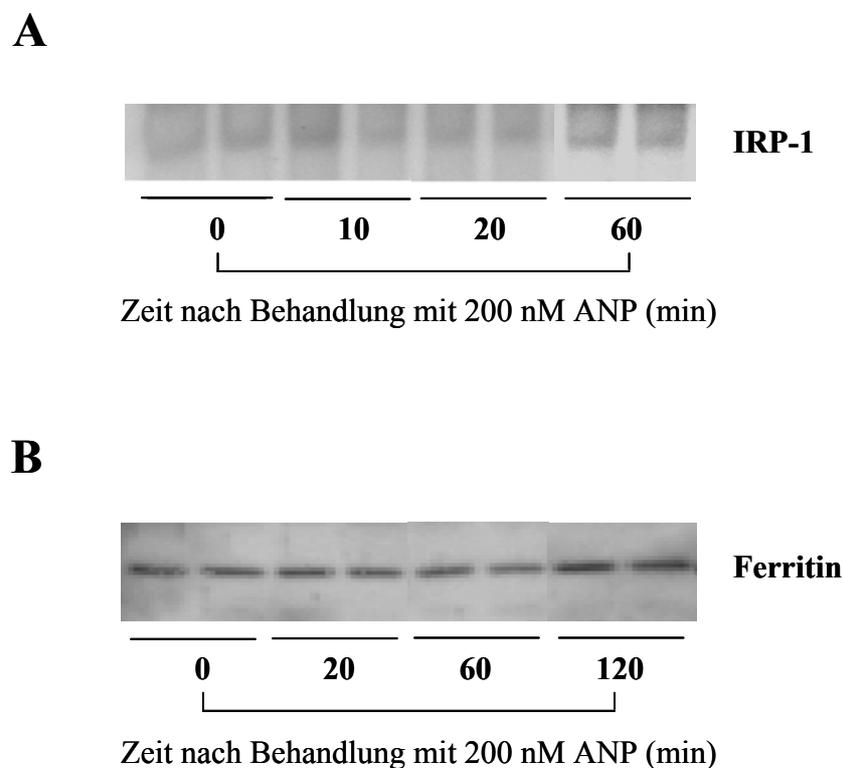


Bild 3.8: *Einfluss von ANP auf die IRP-1 Bindungsaktivität und die Ferritinexpression in isolierten Rattenhepatozyten*

Rattenhepatozyten wurden wie unter „Material und Methoden“ beschrieben isoliert und mit ANP (200 nM) behandelt. Anschließend wurde zur Bestimmung der RNA-Bindungsaktivität (**A**) ein EMSA durchgeführt. Dargestellt ist ein exemplarischer Shift aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit $n=2$. Nach Herstellung von Proteinextrakten wurde die Ferritinexpression mittels Western Blot (**B**) untersucht. Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen mit jeweils $n=2$.

3.2.1.4 Versuche an Kupfferzell-depletierten Rattenlebern

Da die Effekte nicht in isolierten Hepatozyten gezeigt werden konnten, wurden die Versuche an Kupfferzell-depletierten Organen wiederholt, um zu überprüfen, ob Kupfferzellen an der Vermittlung der ANP-Effekte beteiligt sind.

In dieser Versuchsreihe konnte der ANP-Effekt auf die IRP-1 Bindungsaktivität nicht reproduziert werden, wie in **Bild 3.9** zu sehen ist.

Somit konnte auch keine Aussage über eine mögliche Beteiligung von Kupfferzellen an den ANP-Effekten gemacht werden.

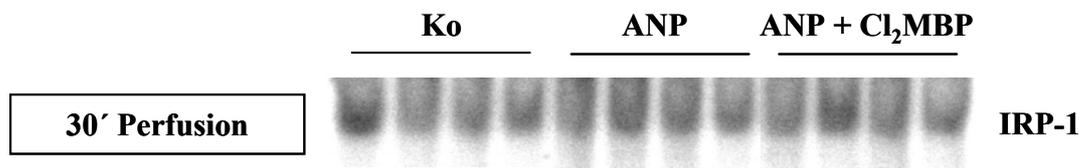


Bild 3.9: *IRP-1 Bindungsaktivität in Kupfferzell-depletierten Lebern*

Die Kupfferzellen der Versuchstiere wurden wie unter „Material und Methoden“ beschrieben mit Clodronat (Cl₂MBP) depletiert. Die Tiere der Kontrollgruppe (Ko) und der ANP-präkonditionierten Gruppe wurden entsprechend mit NaCl vorbehandelt. Nach 30 min Perfusion in An- und Abwesenheit von ANP (200 nM) wurden zytoplasmatische Extrakte hergestellt und ein REMSA durchgeführt. Gezeigt ist ein exemplarischer Shift aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit n=4.

3.2.1.5 Perfusion mit HO-1 Inhibitor

Ob die Verminderung der IRP-1 Bindungsaktivität durch Präkonditionierung mit ANP auf die Erhöhung der HO-1 mRNA zurückzuführen ist, wurde an Lebern, die mit dem HO-1 Inhibitor Zinnprotoporphyrin (SnPP) perfundiert wurden, untersucht. SnPP konnte den ANP-Effekt jedoch nicht aufheben und hatte selbst auch keinen Einfluss auf die IRP-1 Bindungsaktivität (**Bild 3.10 A**). Zugabe von Mercaptoethanol führte wiederum zur vollständigen Aktivierung von IRP-1 und diente somit als Ladungskontrolle (**Bild 3.10 B**).

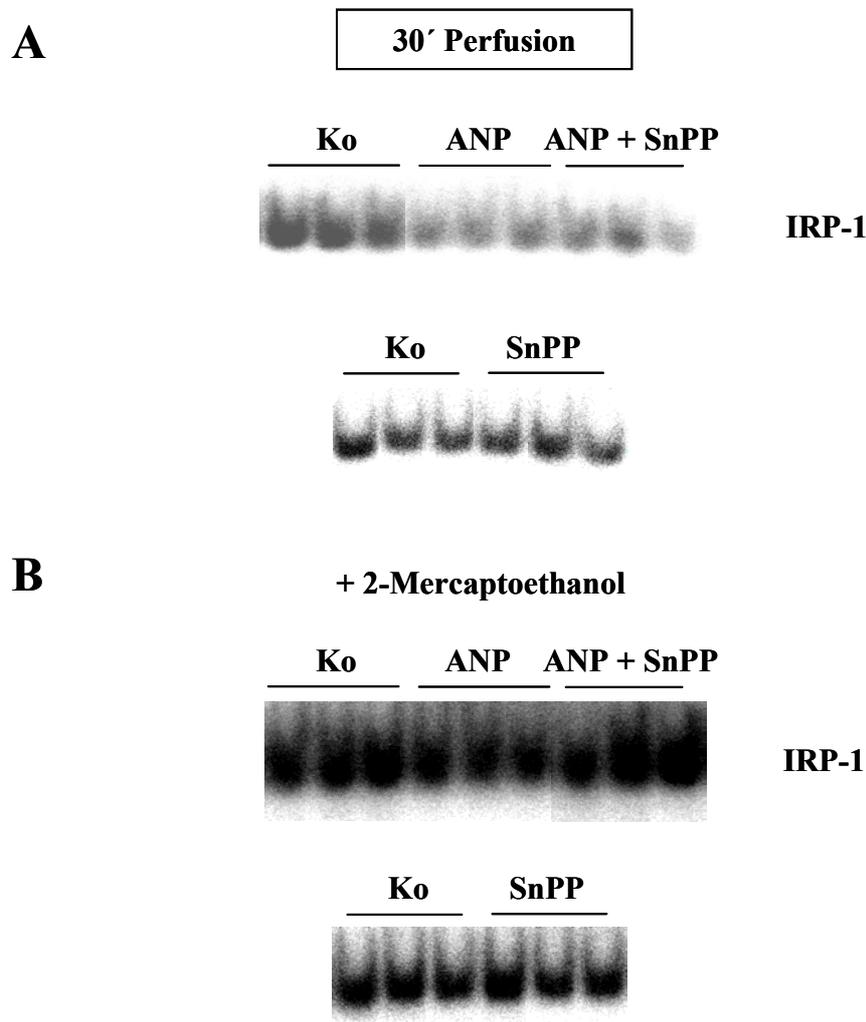


Bild 3.10: *Einfluss des HO-1 Inhibitors Zinnprotoporphyrin (SnPP) auf die IRP-1 Bindungsaktivität*

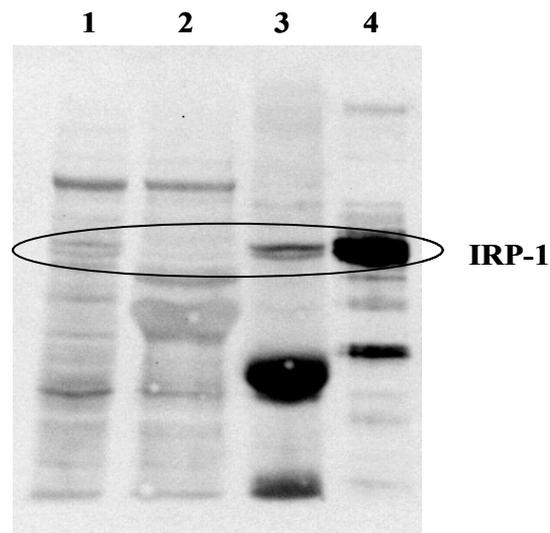
Lebern wurden mit und ohne ANP (200 nM) in An- und Abwesenheit von SnPP (1 μ M) 30 min perfundiert. Nach Herstellung von zytoplasmatischen Proteinextrakten wurde wie unter „Material und Methoden“ beschrieben ein REMSA durchgeführt. **A:** Vergleich der IRP-1 Bindungsaktivität in unbehandelten Lebern (Ko) und in ANP-präkonditionierten Lebern in An- und Abwesenheit von SnPP und Einfluss von SnPP allein auf die Bindungsaktivität von IRP-1. Gezeigt ist jeweils ein exemplarischer Shift von vier voneinander unabhängigen Experimenten mit n=4-5. **B:** Zugabe von Mercaptoethanol als Ladungskontrolle. Dargestellt ist je ein repräsentativer Shift aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit n=3.

3.2.1.6 Phosphorylierung von IRP-1

Um zu untersuchen, ob die hormonelle Präkonditionierung mit ANP die IRP-1 Bindungsaktivität durch Hemmung der Proteinkinase C (PKC) und damit durch eine verminderte Phosphorylierung von IRP-1 verringert, wurde IRP-1 zunächst mittels Immunpräzipitation aus Proteinextrakten angereichert und anschließend ein Western Blot mit einem gegen Phosphoserin gerichteten Antikörper durchgeführt.

Zunächst wurde überprüft, ob IRP-1 durch Immunpräzipitation aus den Leberhomogenaten erfolgreich angereichert werden konnte. Dazu wurden das Leberhomogenat vor der Immunpräzipitation, der Überstand nach der Fällung und das Präzipitat im Western Blot mit einem IRP-1 Antikörper untersucht.

Wie **Bild 3.11** zeigt, konnte IRP-1 im Präzipitat angereichert werden, im Überstand ließ sich IRP-1 nicht mehr detektieren.



- 1 = Leberhomogenat vor Immunpräzipitation**
(unbehandelte Kontroll-Leber, 30 min Perfusion)
- 2 = Überstand nach Immunpräzipitation**
- 3 = Präzipitat**
- 4 = rekombinantes IRP-1**

Bild 3.11: Anreicherung von IRP-1 mittels Immunpräzipitation

Lebern männlicher Sprague-Dawley Ratten wurden 30 min perfundiert. Nach Herstellung von Proteinextrakten wurde IRP-1 wie unter „Material und Methoden“ beschrieben immunpräzipitiert und anschließend ein Western Blot mit einem gegen IRP-1 gerichteten Antikörper durchgeführt. Aufgetragen wurden 40 µg des Leberhomogenats vor der Immunpräzipitation, 40 µl des Überstands sowie 40 µl des Präzipitats. 1 µg rekombinantes IRP-1 diente als Positivkontrolle.

Danach wurde der Einfluss der ANP-Präkonditionierung auf den Phosphorylierungsstatus von IRP-1 untersucht.

Dabei konnte allerdings in den mit ANP präkonditionierten Organen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollorganen keine geringere Phosphorylierung von IRP-1 nachgewiesen werden (**Bild 3.12 A**). Zur Kontrolle, ob gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, wurde der Western Blot nach Ablösung des Phosphoserin-Antikörpers mit einem gegen IRP-1 gerichteten Antikörper erneut detektiert. Zur Überprüfung der Spezifität der Immunpräzipitation wurde zusätzlich eine Präzipitation mit einem aus dem Kaninchen gewonnenen Kontrollserum durchgeführt (**Bild 3.12 B**).

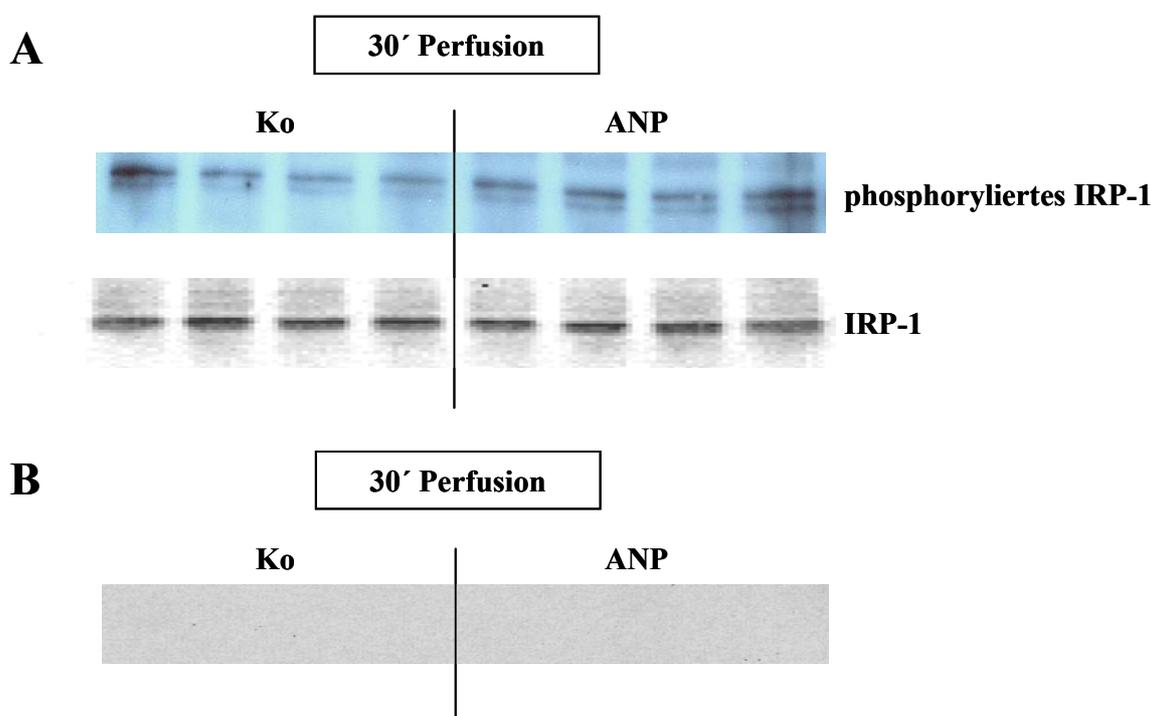


Bild 3.12: Einfluss von ANP auf den Phosphorylierungsstatus von IRP-1

Die Lebern wurden 30 min in An- und Abwesenheit von ANP (200 nM) perfundiert. Nach Herstellung von Proteinextrakten wurde IRP-1 wie in „Material und Methoden“ beschrieben immunpräzipitiert und ein Phosphoserin Western Blot von unbehandelten Kontrollorganen (Ko) und von mit ANP präkonditionierten Organen durchgeführt. Dargestellt ist ein Western Blot mit n=4 pro Gruppe. Nach Ablösung des Phosphoserin-Antikörpers (siehe „Material und Methoden“) wurde der Western Blot mit einem IRP-1 Antikörper erneut detektiert (**A**). Zur Überprüfung der Spezifität wurde eine Präzipitation mit einem aus dem Kaninchen gewonnenen Kontrollserum durchgeführt (**B**).

3.2.2 PRÄKONDITIONIERUNG MIT ALPHA-LIPONSÄURE

α -Liponsäure besitzt wie bereits erwähnt eisenchelatierende Eigenschaften (Biewenga *et al.*, 1997; Packer, 1998). Eisen seinerseits spielt eine wichtige Rolle beim Ischämie-Reperfusionsschaden, da es durch Beteiligung an der Bildung freier Radikale zum oxidativen Stress beiträgt (Arora und Gores, 1996).

Um zu untersuchen, ob eine Präkonditionierung mit α -Liponsäure die Eisenhomöostase beeinflussen und auf diese Weise zum Schutz vor Ischämie-Reperfusionsschäden beitragen kann, wurde die RNA-Bindungsaktivität des Iron Regulatory Protein-1 (IRP-1) in Lebern mit und ohne α -Liponsäure-Präkonditionierung mittels RNA Electrophoretic Mobility Shift Assay (REMSA) untersucht.

3.2.2.1 IRP-Bindungsaktivität im Verlauf von warmer Ischämie und Reperfusion

Zuerst wurde an unbehandelten Kontrollorganen untersucht, ob es im Verlauf von warmer Ischämie und Reperfusion zu Veränderungen der RNA-Bindungsaktivität von IRP-1 kommt. Wie in **Bild 3.13** zu sehen ist, blieb die IRP-Bindungsaktivität im Zeitverlauf unverändert.

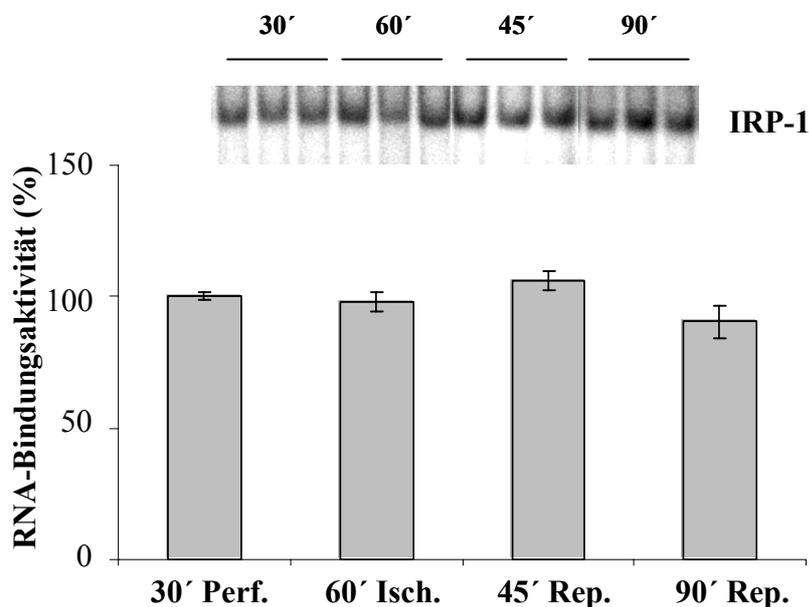


Bild 3.13: Zeitverlauf der RNA-Bindungsaktivität von IRP-1

Lebern männlicher Sprague-Dawley Ratten wurden zunächst 30 min perfundiert. Danach wurden die Organe 1 h bei 37°C gelagert (Ischämiephase) und anschließend 45 und 90 min reperfundiert. Nach Herstellung zytoplasmatischer Proteinextrakte wurde wie in „Material und Methoden“ beschrieben ein REMSA durchgeführt. Das Bild zeigt einen exemplarischen Shift sowie die densitometrische Auswertung aus drei voneinander unabhängigen Experimenten mit jeweils n=5. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

3.2.2.2 Einfluss von α -Liponsäure auf die IRP-Bindungsaktivität

Bei den folgenden Untersuchungen zum Einfluss von α -Liponsäure auf die IRP-Bindungsaktivität konnte gezeigt werden, dass eine Präkonditionierung mit α -Liponsäure bereits nach 30 min Perfusion zu einer deutlichen Verminderung der IRP-1 Bindungsaktivität führte. Diese Reduktion war auch nach der warmen Ischämie noch zu sehen, im Verlauf der Reperfusion verschwand dieser Effekt jedoch (**Bild 3.14**).

Um auszuschließen, dass unterschiedliche Mengen an IRP-1 aufgetragen wurden, wurde den Proben 2-Mercaptoethanol zugesetzt, welches IRP-1 vollständig aktiviert.

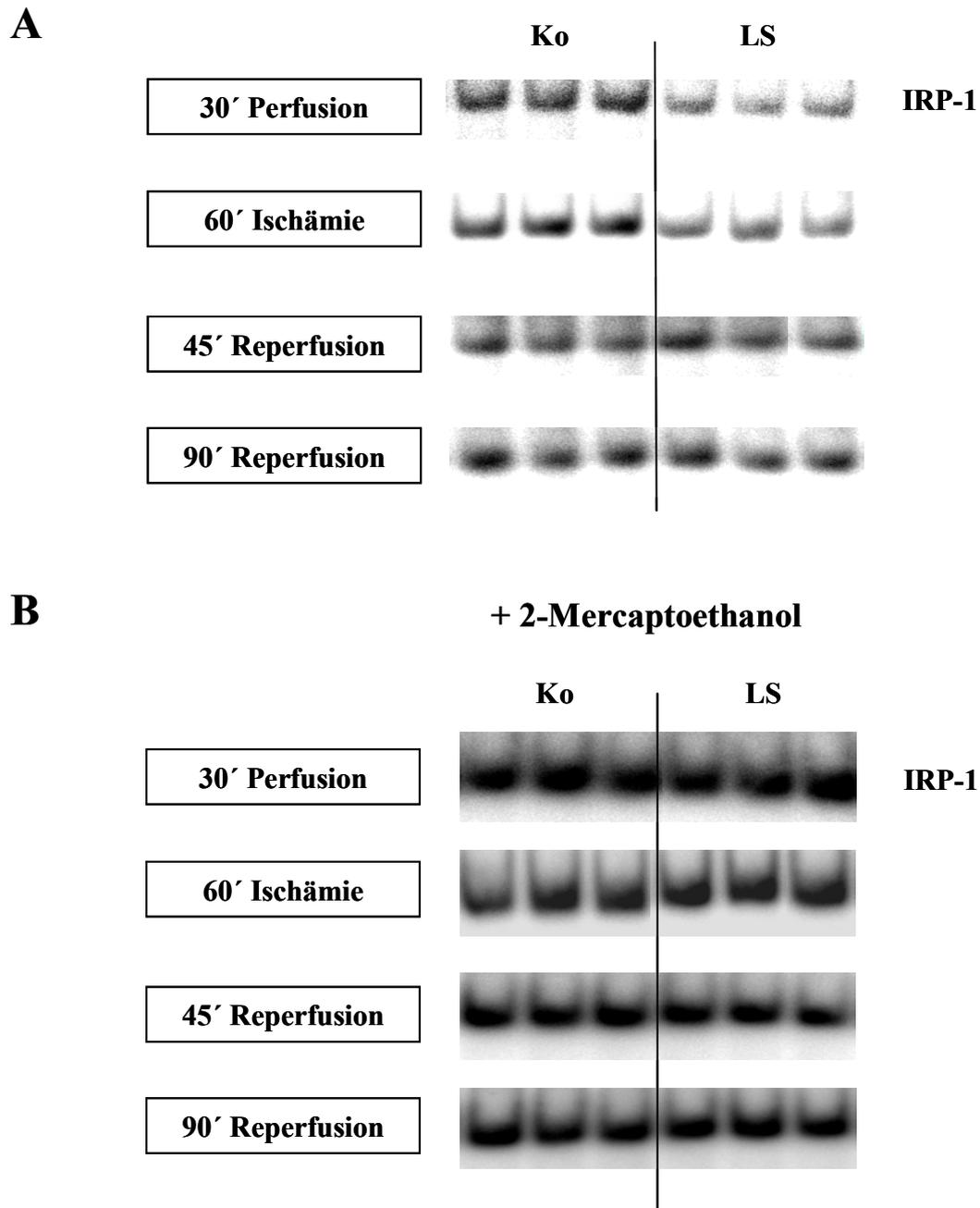


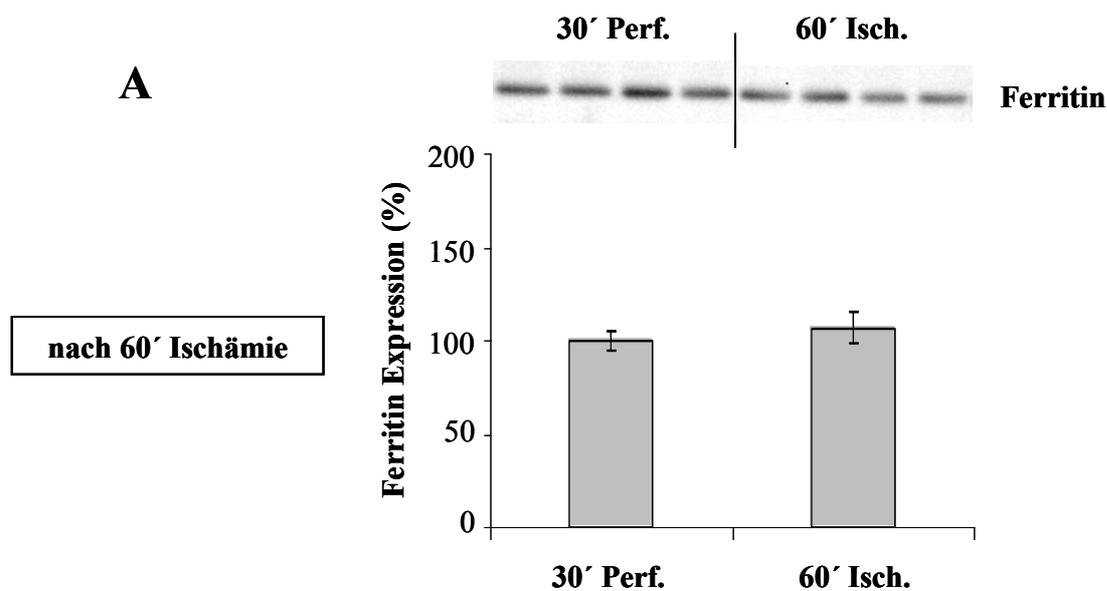
Bild 3.14: *Reduktion der RNA-Bindungsaktivität von IRP-1 durch Präkonditionierung mit α -Liponsäure*

Die Lebern wurden 30 min in An- und Abwesenheit von α -Liponsäure (50 μ M) perfundiert, 60 min bei 37°C gelagert und anschließend 45 und 90 min reperfundiert. Danach wurden wie unter „Material und Methoden“ beschrieben zytoplasmatische Extrakte hergestellt und ein REMSA durchgeführt. **A:** Es wurden jeweils unbehandelte Organe (Ko) den mit α -Liponsäure präkonditionierten Organen (LS) gegenübergestellt. Dargestellt ist pro Zeitpunkt jeweils ein exemplarischer Shift aus mind. 5 voneinander unabhängigen Experimenten mit n=4-5. **B:** Die Zugabe von 2-Mercaptoethanol führte zu einer vollständigen Aktivierung der IRP-Bindungsaktivität und diente somit als Ladungskontrolle. Gezeigt ist jeweils ein Shift mit n=3.

Eine Verminderung der IRP-1 Bindungsaktivität durch Präkonditionierung mit α -Liponsäure, könnte eine erhöhte Expression des zytoprotektiven Ferritin zur Folge haben. Um dies genauer zu untersuchen, wurden daher als nächstes Ferritin Western Blots durchgeführt.

3.2.2.3 Ferritinexpression im Verlauf von warmer Ischämie und Reperfusion

Zunächst wurde wiederum an unbehandelten Lebern die Ferritinsynthese im Zeitverlauf von Ischämie und Reperfusion betrachtet. Nach 30 min Perfusion und 60 min Ischämie konnten keine Veränderungen der Ferritin Proteinmenge detektiert werden (**Bild 3.15 A**). Während der Reperfusion wurde Ferritin allerdings nach 90 min signifikant induziert (**Bild 3.15 B**)



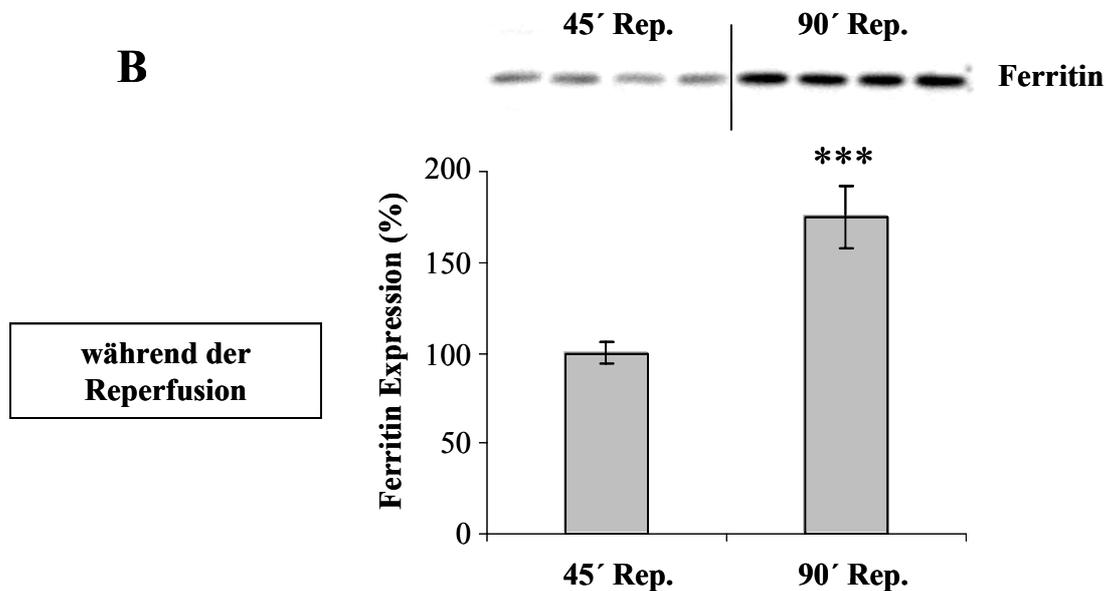


Bild 3.15: Induktion von Ferritin während der Reperfusion

Die Lebern wurden 30 min perfundiert, 60 min bei 37°C gelagert und anschließend 45 und 90 min reperfundiert. Nach Herstellung von Proteinextrakten wurde wie in „Material und Methoden“ beschrieben ein Ferritin Western Blot durchgeführt. Gezeigt ist je ein exemplarischer Blot und die densitometrische Auswertung aus vier voneinander unabhängigen Experimenten mit n=5. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM. ***p<0,001 kennzeichnet signifikante Unterschiede zum Zeitpunkt 45' Reperfusion (student's t-test).

3.2.2.4 Einfluss von α -Liponsäure auf die Expression von Ferritin

Nun wurde untersucht, ob eine Präkonditionierung mit α -Liponsäure die Expression von Ferritin beeinflussen kann. Ein Vergleich zwischen unbehandelten Lebern und mit α -Liponsäure präkonditionierten Organen ergab jedoch zu keinem der untersuchten Zeitpunkte einen Unterschied bezüglich der Ferritinexpression, wie in **Bild 3.16** zu sehen ist.

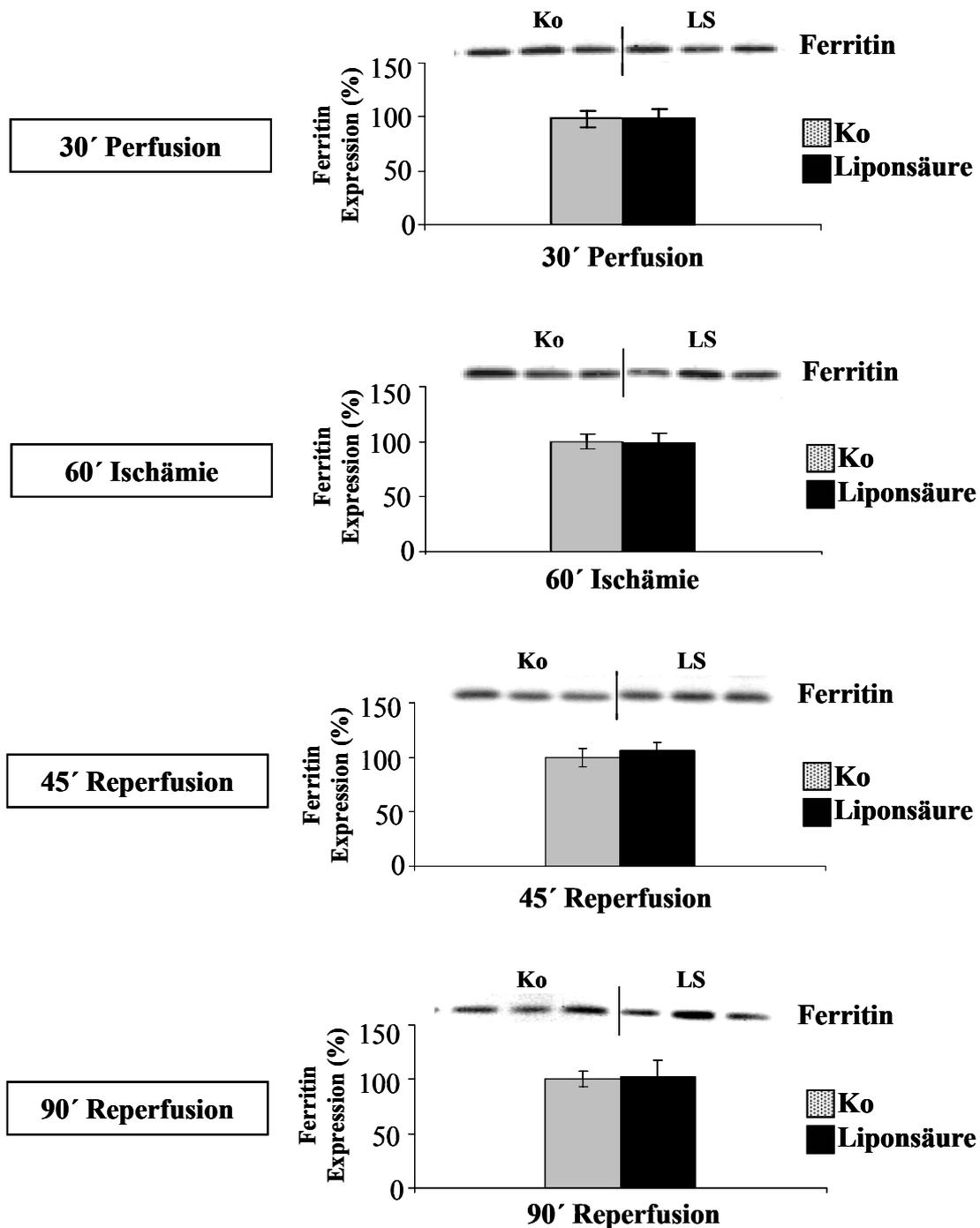


Bild 3.16: Einfluss von α -Liponsäure auf die Ferritinexpression

Lebern männlicher Sprague-Dawley Ratten wurden 30 min in An- und Abwesenheit von α -Liponsäure (LS, 50 μ M) perfundiert, 60 min bei 37°C gelagert und anschließend 45 und 90 min reperfundiert. Nach Herstellung von Proteinextrakten wurde wie unter „Material und Methoden“ beschrieben ein Ferritin Western Blot durchgeführt. Unbehandelte Organe (Ko) sind bei jedem Zeitpunkt den mit α -Liponsäure präkonditionierten Lebern (LS) gegenübergestellt. Gezeigt ist pro Zeitpunkt jeweils ein exemplarischer Western Blot und die densitometrische Auswertung von 3-5 voneinander unabhängigen Experimenten mit je n=5. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM.

3.2.3 ISCHÄMISCHE PRÄKONDITIONIERUNG

Ischämische Präkonditionierung, also 2-10 min Ischämie mit anschließender Reperfusion schützt die Leber vor Ischämie-Reperfusionsschäden nach warmer (Lloris-Carsi *et al.*, 1993; Peralta *et al.*, 1997) und kalter (Yin *et al.*, 1998; Arai *et al.*, 1999) Ischämie. Die genauen molekularen Mechanismen der Ischämischen Präkonditionierung sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Berenshtein *et al.* postulieren im Herzen eine Beteiligung von Ferritin und Eisen (Berenshtein *et al.*, 2002). Seine Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass es in ischämisch präkonditionierten Rattenherzen einerseits zu einer geringeren Umverteilung und Mobilisierung von Eisen kommt, das in hohen Konzentrationen zum Schaden beiträgt, und andererseits die Expression von Ferritin erhöht ist. Außerdem war die Sättigung von Ferritin mit Eisen in präkonditionierten Herzen geringer.

3.2.3.1 Einfluss auf die IRP-Bindungsaktivität und Ferritinexpression

Um zu untersuchen, ob auch in der Leber die Expression von Ferritin in ischämisch präkonditionierten Organen erhöht ist, führten wir Ferritin Western Blots durch.

Die Expression von Ferritin war in den präkonditionierten Organen bereits vor der Ischämiephase signifikant erhöht. Dieser Effekt war auch nach 60 min Ischämie noch nachzuweisen. Wie **Bild 3.17** zeigt, wurde auch hier in den präkonditionierten Organen signifikant mehr Ferritin exprimiert als in den Kontroll-Lebern.

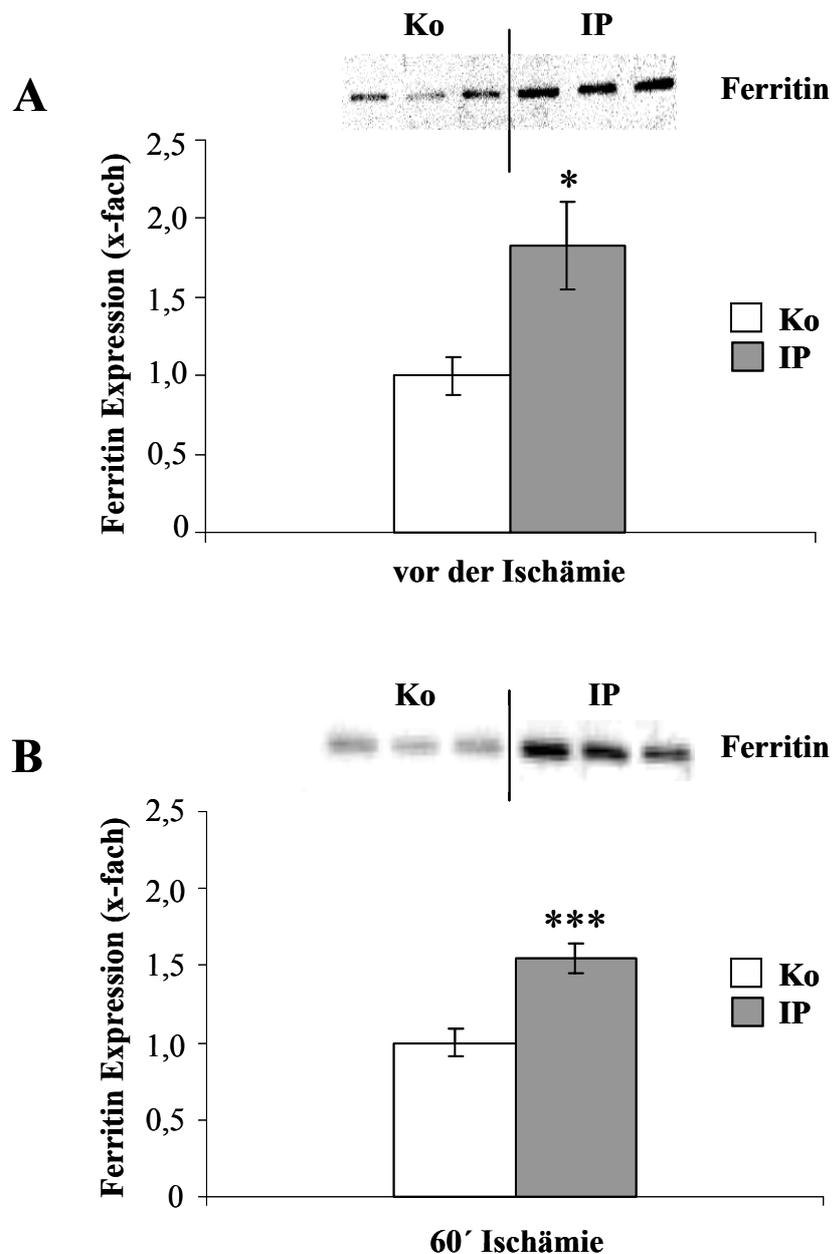


Bild 3.17: Induktion der Ferritinexpression durch Ischämische Präkonditionierung

Die Expression von Ferritin wurde in unbehandelten Lebern (Ko) und in ischämisch präkonditionierten Organen (IP; 10 min Ischämie, 10 min Reperfusion) kurz vor der Ischämiephase (A) und nach 60 min Ischämie (B) wie in „Material und Methoden“ beschrieben mittels Western Blot untersucht. Das Bild zeigt jeweils einen repräsentativen Western Blot und die densitometrische Auswertung von mind. drei voneinander unabhängigen Experimenten mit je n=4-5. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. *p<0,05 und ***p<0,001 kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und ischämisch präkonditionierten Lebern (student's t-test).

Da die Ferritinexpression vor allem posttranskriptionell durch Eisenregulierende Proteine (IRPs) reguliert wird, wurde als nächstes die RNA-Bindungsaktivität von IRP-1 mittels REMSA untersucht.

Kurz vor der Ischämie war die IRP-Bindungsaktivität in den präkonditionierten Organen tendenziell erniedrigt, nach 60 min Ischämie konnten diese Unterschiede zwischen Kontrolle und Ischämischer Präkonditionierung jedoch nicht mehr gezeigt werden (**Bild 3.18**).

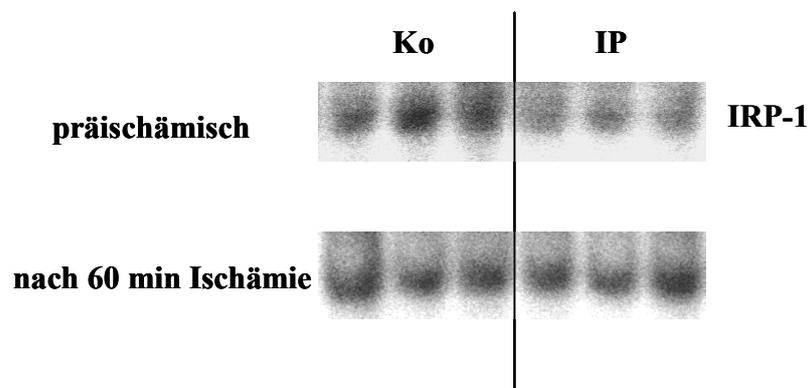


Bild 3.18: *Einfluss der Ischämischen Präkonditionierung auf die RNA-Bindungsaktivität von IRP-1*

Die RNA-Bindungsaktivität von IRP-1 kurz vor und nach 60 min Ischämie wurde in unbehandelten Kontrollorganen (Ko) sowie in ischämisch präkonditionierten Lebern (IP) nach Herstellung zytoplasmatischer Proteinextrakte wie in „Material und Methoden“ beschrieben mittels REMSA untersucht. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Shift aus vier voneinander unabhängigen Experimenten mit je n=3-5.

3.3 EINFLUSS VON ANP AUF DIE EXPRESSION VON GAPDH

3.3.1 GAPDH mRNA-EXPRESSION

3.3.1.1 Ergebnisse der RT-PCR

Da eine Induktion der Hämoxxygenase-1 (HO-1) als protektiver Mechanismus beim Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber angesehen wird, sollte ursprünglich die HO-1 mRNA-Expression in den mit ANP präkonditionierten Lebern im Vergleich zu unbehandelten Lebern mittels RT-PCR untersucht werden. Vor der eigentlichen PCR mit spezifischen Primern für die HO-1 mRNA der Ratte wurde zunächst eine PCR mit Primern für das Housekeeping Gene Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt, um zu gewährleisten, dass für die HO-1 PCR gleiche Mengen cDNA eingesetzt wurden. Dabei wurde ein sehr interessanter und überraschender Effekt beobachtet. Wie in **Bild 3.19** zu sehen ist, zeigten ANP-präkonditionierte Lebern eine deutliche Reduktion der GAPDH mRNA-Expression nach 24 h kalter Ischämie sowie nach 45 und 120 min Reperfusion.

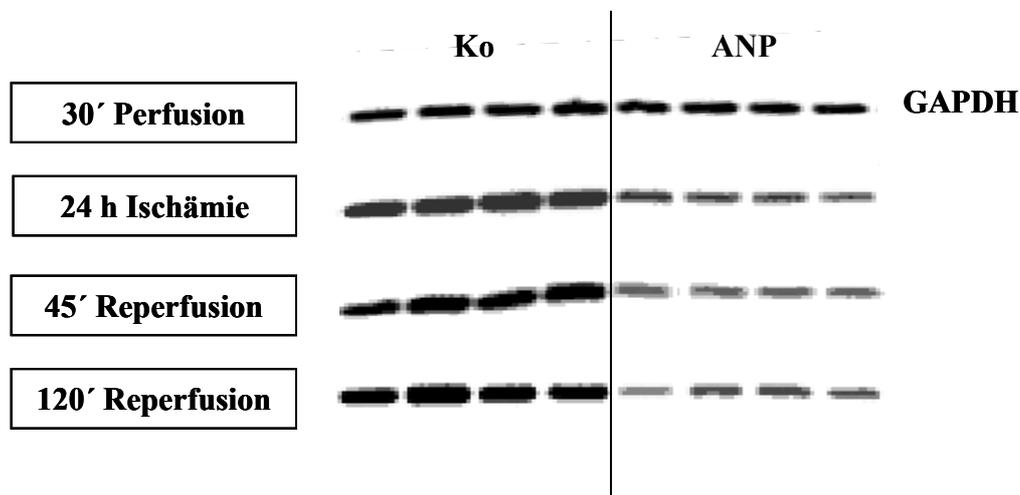


Bild 3.19: Einfluss von ANP auf die GAPDH mRNA-Expression (RT-PCR)

Die Lebern wurden in An- und Abwesenheit von ANP (200 nM) 30 min perfundiert, 24 h bei 4°C in UW-Lösung gelagert und anschließend 45 und 120 min reperfundiert. Nach Isolierung der totRNA mit der Guanidiniumthiocyanat/Cäsiumchlorid-Methode wurde wie unter „Material und Methoden“ beschrieben eine RT-PCR mit GAPDH spezifischen Primern durchgeführt und unbehandelte Lebern (Ko) mit ANP vorbehandelten Lebern verglichen. Abgebildet ist pro Zeitpunkt ein Experiment mit je n=4.

Diese Ergebnisse ließen eine Regulation der GAPDH-Expression in der Leber durch ANP-Präkonditionierung vermuten. Welche Rolle dies beim hepatischen Ischämie-Reperfusionsschaden spielen könnte, ergab eine ausführliche Literaturrecherche. In der Literatur mehren sich in den letzten Jahren Hinweise auf eine mögliche Regulation von GAPDH. So ist z.B. die GAPDH mRNA-Expression nach Ischämie am Herzen (Liedtke und Lynch, 1999) und nach oxidativem Stress in isolierten Gefäßen (Ito *et al.*, 1996) erhöht. Außerdem wird GAPDH eine Rolle bei der Auslösung von Apoptose zugeschrieben (Sirover, 1999). Überdies übt GAPDH neben seiner glykolytischen Funktion im Citratzyklus auch noch weitere bisher noch nicht genauer charakterisierte Funktionen in der Zelle aus. Eine Regulation der GAPDH-Expression könnte also durchaus eine Rolle beim Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber spielen und sollte daher genauer untersucht werden.

Da man mit der hier angewendeten Methode der RT-PCR jedoch nur semiquantitative Aussagen treffen kann, sollte zur genaueren Quantifizierung eine andere Methode verwendet werden, die Real-Time PCR. Die Grundlagen und das Prinzip dieser Methode wurden in der Einleitung bereits ausführlich dargestellt.

Die Untersuchung der HO-1 mRNA-Expression im Verlauf von Ischämie und Reperfusion wurde von Herrn Dr. T. Gerwig weitergeführt (Kiemer *et al.*, 2003).

3.3.1.2 Ergebnisse der Real-Time PCR

Zunächst wurden von Herrn Dr. A. Höflich (Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht, Ludwig-Maximilians-Universität München) mit der SYBR[®] Green-Methode (siehe „Material und Methoden“) einige Vorversuche durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in **Bild 3.20** dargestellt. Die durch RT-PCR nachgewiesenen Effekte schienen sich zu bestätigen. Auch mit der Real-Time PCR konnte im Vergleich zu unbehandelten Organen durch ANP eine signifikante Reduktion der GAPDH mRNA um ca. 15% nach 24 h Ischämie gezeigt werden. Allerdings war auch schon nach 30 min Perfusion ein deutlicher, sogar noch stärkerer Effekt zu sehen: ANP reduzierte die GAPDH mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle signifikant um ca. 36%. Außerdem nahm die GAPDH mRNA-Menge in der Kontrollgruppe nach 24 h Ischämie um ca. 27% ab. Über die GAPDH mRNA-Expression während der Reperfusion konnte leider keine Aussage getroffen werden, da die Effizienz der PCR-Reaktion viel geringer war als bei den anderen Zeitpunkten, so dass die erhaltenen Werte nicht für eine Auswertung verwendet werden konnten.

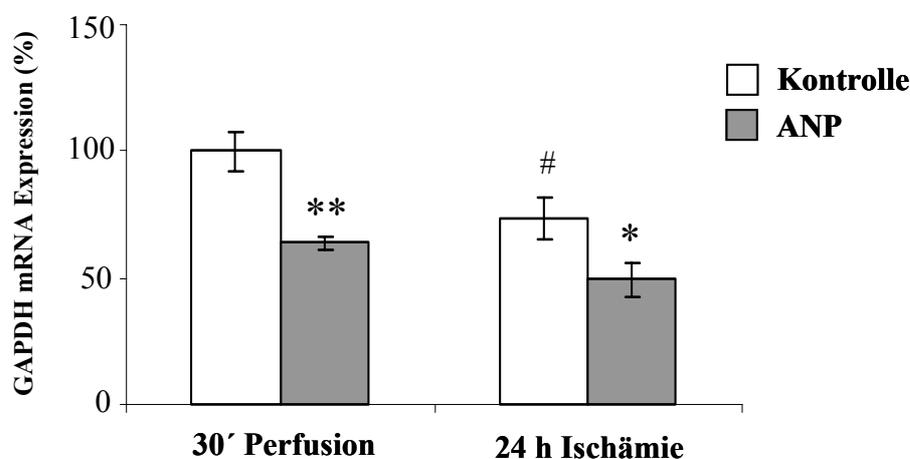


Bild 3.20: Einfluss von ANP auf die GAPDH mRNA-Expression (Real-Time PCR, SYBR® Green)

Die Lebern wurden 30 min in An- und Abwesenheit von ANP (200 nM) perfundiert und 24 h bei 4°C in UW-Lösung gelagert. Nach Isolierung der totRNA und Reverser Transkription wurde wie in „Material und Methoden“ beschrieben eine Real-Time PCR mit der SYBR® Green-Methode durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit jeweils n=3 pro Gruppe. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ± SEM. **p<0,01 und *p<0,05 kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den unbehandelten Lebern (Kontrolle) und den mit ANP präkonditionierten Lebern. #p<0,05 zeigt signifikante Unterschiede zu 30 min Perfusion der Kontrollgruppe (student's t-test).

Die RT-PCR und die Real-Time PCR lieferten zwar nicht identische Ergebnisse, doch bei beiden Methoden reduzierte ANP die Expression der GAPDH mRNA. Daher sollte nun die Real-Time PCR auch an unserem Lehrstuhl etabliert werden, um mit nochmals frisch isolierter RNA und einer höheren Probenzahl die Versuche zu wiederholen und den Effekt zu bestätigen. Die SYBR® Green-Methode ist unspezifischer als die Verwendung einer TaqMan® Sonde, da sich SYBR® Green an jede Art doppelsträngiger DNA anlagert, also auch an Primer-Dimere, die sich ausbilden können und die auf diese Weise bei der Quantifizierung mit erfasst werden. Daher wurde eine GAPDH PCR unter Verwendung einer spezifischen Sonde wie in „Material und Methoden“ beschrieben etabliert.

Die bisherigen Ergebnisse konnten jedoch nicht reproduziert werden. Präkonditionierung mit ANP verringerte zu keinem Zeitpunkt die GAPDH mRNA-Level. Im Verlauf von Ischämie und Reperfusion zeigte sich lediglich eine tendenzielle Abnahme der GAPDH mRNA-Expression (**Bild 3.21**).

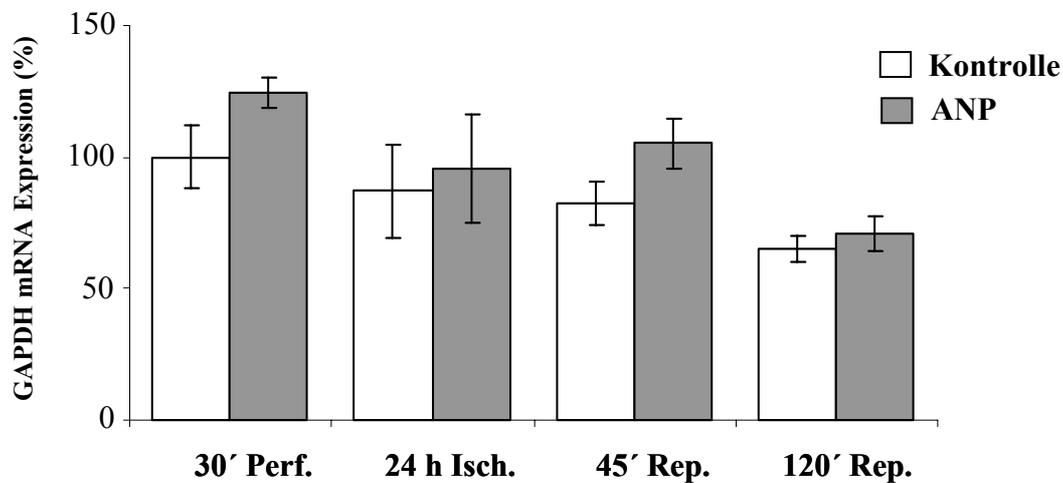


Bild 3.21: Einfluss von ANP auf die GAPDH mRNA-Expression (Real-Time PCR, TaqMan® Sonde)

Die Lebern wurden 30 min in An- und Abwesenheit von ANP (200 nM) perfundiert, 24 h bei 4°C in UW-Lösung gelagert und anschließend 45 und 120 min reperfundiert. Nach Isolierung der totRNA und Reverser Transkription wurde wie in „Material und Methoden“ beschrieben eine Real-Time PCR mit einer TaqMan® Sonde durchgeführt. Das Bild zeigt die Ergebnisse aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit jeweils n=4–5 pro Gruppe. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM.

3.3.2 GAPDH PROTEINEXPRESSION

Parallel zu den Untersuchungen auf mRNA-Ebene wurden GAPDH Western Blots durchgeführt, um Aussagen über eine Veränderung der Proteinexpression im Verlauf von Ischämie und Reperfusion und nach ANP-Präkonditionierung zu erhalten. Wie in **Bild 3.22** zu sehen ist, konnte auf Protein Ebene jedoch keine Veränderung der GAPDH-Expression beobachtet werden.

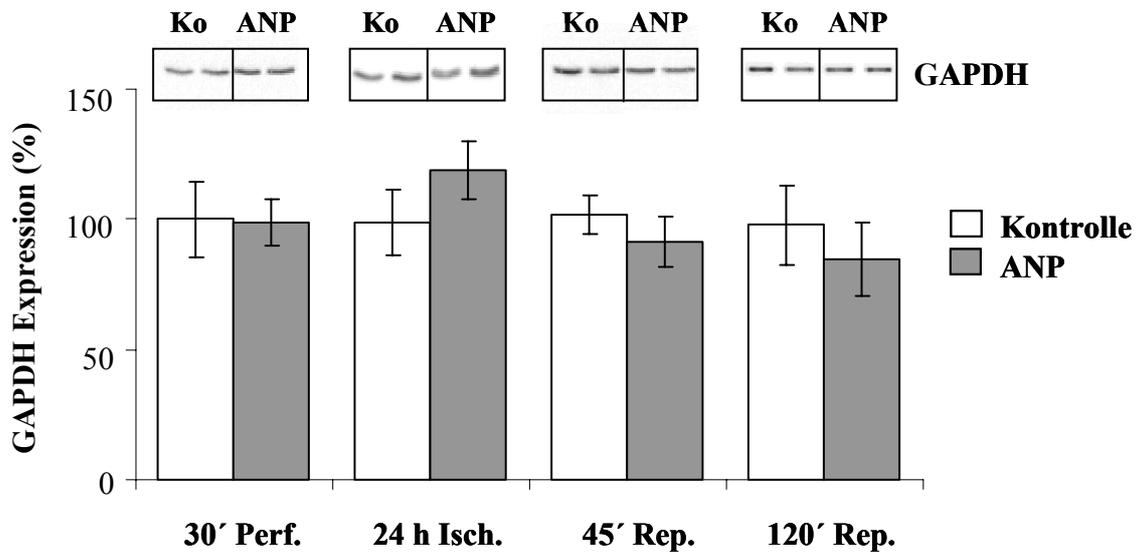


Bild 3.22: GAPDH Proteinexpression

Nach 30 min Perfusion in An- und Abwesenheit von ANP (200 nM) wurden die Lebern 24 h bei 4°C in UW-Lösung gelagert und anschließend 45 und 120 min reperfundiert. Nach Herstellung von Proteinextrakten wurde wie unter „Material und Methoden“ beschrieben ein GAPDH Western Blot durchgeführt. Das Bild zeigt einen repräsentativen Western Blot und die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung aus mind. vier voneinander unabhängigen Experimenten mit je n=3-4. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM.

4 DISKUSSION

4.1 EINFLUSS VON ANP AUF DIE AKTIVITÄT VON MATRIX METALLOPROTEINASEN

MMPs sind wesentlich am IRS in der Leber beteiligt, da sie die extrazelluläre Matrix, in die die sinusoidalen Endothelzellen eingebettet sind, abbauen können und so letztendlich zu einer Ablösung der Zellen führen. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob eine Präkonditionierung mit ANP über eine Inhibierung der MMP-Aktivität zum Schutz vor IRS beitragen kann.

4.1.1 ANWESENHEIT VON MMPs

In unserem Modell der isoliert perfundierten Rattenleber konnten wir mittels Zymographie in den gesammelten Eluaten nach 24 h kalter Ischämie die Anwesenheit mehrerer MMPs nachweisen. Durch Einsatz des MMP-Inhibitors EDTA konnte gezeigt werden, dass die gelatinolytische Aktivität spezifisch für MMPs ist und nicht andere Proteasen für den Abbau der Gelatine verantwortlich sind. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Untersuchungen von Upadhyia *et al.*, der in den Eluaten von Ratten- und Menschenlebern nach kalter Ischämie die Anwesenheit verschiedener MMPs nachwies, wobei der Hauptanteil bei den beiden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 lag (Upadhyia *et al.*, 1997). Wir vermuten, dass es sich bei den detektierten Banden um verschiedene Formen von MMP-2 handelt, nämlich um die inaktive Vorstufe proMMP-2 (72 kDa), die aktive Form (62 kDa), und um eine weitere Matrix Metalloproteinase. Bei der letzteren könnte es sich um eine speziell in der Ratte oder in Mäusen vorkommende glykosylierte Form von MMP-2 handeln. Dies wird zumindest von Lalu *et al.* diskutiert, die im Herzen nach Ischämie und Reperfusion exakt das gleiche MMP-Muster detektieren konnten (Lalu *et al.*, 2002). Upadhyia *et al.* wiesen zwar noch andere MMPs in den Eluaten nach, vor allem MMP-9 (92/84 kDa), doch sie verwendeten für ihre Versuche zur Konservierung Euro-Collins Lösung und nicht wie wir UW-Lösung, deren Bestandteile Lactobionat und Glutathion die MMP-Aktivität herabsetzen (Upadhyia und Strasberg, 2000). Desweiteren konnten Upadhyia *et al.* durch Inkubation mit dem MMP-Aktivator APMA zeigen, dass es sich bei den in den Rattenuaten nachgewiesenen MMPs sowohl um aktive als auch um latente Formen handelt. Dies deckt sich auch mit unseren Ergebnissen.

4.1.2 EINFLUSS VON ANP AUF MMPs

In der Literatur gibt es fast keine Veröffentlichungen zu einem Einfluss von Natriuretischen Peptiden auf MMPs. Tsuruda *et al.* konnten zeigen, dass BNP in Herzfibroblasten über den cGMP/PKG Pathway die Expression verschiedener MMPs induzieren kann und diskutieren eine mögliche Rolle von BNP als antifibrinolytisch wirkendes Hormon bei der Regulation der Kollagensynthese (Tsuruda *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu kann ANP die Sekretion von MMP-9 aus aktivierten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) vermindern (Mtairag *et al.*, 2002). Desweiteren reduziert ANP in mit dem Kulturmedium aktivierter PMN stimulierten glatten Muskelzellen (SMC) die Sekretion von Elastase (MMP-12) und schützt so *in vitro* SMC vor Apoptose (Mtairag *et al.*, 2002). Dass für Natriuretische Peptide sowohl inhibierende als auch aktivierende Effekte auf die Expression und die Aktivität von MMPs beschrieben worden sind, ist nicht verwunderlich, da zum einen jeweils sehr verschiedene Modelle verwendet wurden, die sich nicht miteinander vergleichen lassen und zum anderen die Regulation der MMPs sehr komplex ist und von vielen verschiedenen Faktoren abhängt. Auch kann sowohl eine Aktivierung als auch eine Inhibierung der MMPs protektiv sein, je nachdem welchen pathologischen Zustand man betrachtet.

Am Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber sind Matrix Metalloproteinasen wesentlich beteiligt, da sie durch Abbau der Extrazellulären Matrix für die Ablösung der sinusoidalen Endothelzellen verantwortlich sind. Präkonditionierung mit ANP beeinflusste im Modell der isoliert perfundierten Rattenleber weder die Sekretion noch die Aktivierung der MMPs. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal nachgewiesen. Somit scheint ANP seinen Schutz vor Ischämie-Reperfusionsschäden nicht über eine Inhibierung der Matrix Metalloproteinasen zu vermitteln.

4.2 REGULATION VON EISENREGULIERENDEN PROTEINEN UND FERRITIN

4.2.1 HORMONELLE PRÄKONDITIONIERUNG MIT ANP

Da hormonelle Präkonditionierung mit ANP in der isoliert perfundierten Rattenleber bereits nach 30 min Perfusion signifikant die HO-1 mRNA-Menge erhöht (Gerwig *et al.*, 2001, abstract), wurde untersucht, ob ANP über eine Induktion der HO-1 die RNA-Bindungsaktivität von IRP-1 und in Folge davon die Ferritinexpression beeinflussen kann.

4.2.1.1 IRP-Bindungsaktivität und Ferritinexpression im Verlauf von Ischämie und Reperfusion

In unseren Versuchen war die IRP-1 Bindungsaktivität in den Kontrollorganen nach 24 h Ischämie vermindert. Während der Reperfusion kam es zu keiner weiteren Veränderung.

Der Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf die RNA-Bindungsaktivität von IRP-1 wurde bisher kaum untersucht. Tacchini *et al.* konnten zeigen, dass in der Rattenleber nach 1 h Ischämie die IRP-Bindungsaktivität zu Beginn der Reperfusion innerhalb von 30-60 min zunächst abnimmt, im weiteren Verlauf jedoch langsam wieder steigt (Tacchini *et al.*, 1997). Direkt nach der Ischämie sind die Bindungsaktivitäten in ihrem Modell im Vergleich zu den sham-operierten Tieren unverändert. In unserem Modell ist die IRP-1 Bindungsaktivität bereits am Ende der Ischämie verringert. Diese Unterschiede liegen zum einen wahrscheinlich daran, dass es sich bei Tacchini *et al.* um ein *in vivo* Experiment mit warmer Ischämie und Reperfusion handelt und daher nicht direkt mit unserem Modell der isoliert perfundierten Rattenleber verglichen werden kann, zum anderen, dass die vorangegangene Ischämie nur 1 h dauerte und nicht wie bei unseren Versuchen 24 h. Eine Verringerung der IRP-1 Bindungsaktivität wird bei uns wahrscheinlich durch die Hypoxie selbst ausgelöst. Hanson und Leibold konnten zeigen, dass in Hepatoma-Zellen von Ratten nach 6 h Hypoxie die RNA-Bindungsaktivität von IRP-1 vermindert ist (Hanson und Leibold, 1998). Aber auch gegenteilige Effekte wurden beschrieben: Toth *et al.* beobachteten in zwei humanen Zelllinien nach Hypoxie eine Erhöhung der IRP-1 Bindungsaktivität (Toth *et al.*, 1999). Dies beruht wahrscheinlich auf Spezies-spezifischen Unterschieden.

In unserem Modell der isoliert perfundierten Rattenleber blieben die Ferritinlevel im Verlauf von Ischämie und Reperfusion unverändert. Andere Arbeitsgruppen beschrieben dagegen eine

Verminderung der Ferritinlevel, allerdings erst nach mehreren Stunden Reperfusion: Tacchini *et al.* beobachteten in der Rattenleber zunächst eine Verringerung der Ferritinexpression nach 2 h Reperfusion (Tacchini *et al.*, 1997). Nach weiteren 2 h stiegen die Ferritinlevel jedoch wieder auf das ursprüngliche Niveau an. Nach segmentaler Ischämie im Darm kam es zu einer Verminderung der Ferritin Protein- und mRNA-Menge nach 3 und 6 h Reperfusion (Yeh *et al.*, 1998).

Dass einerseits, wie in unserem Fall, die RNA-Bindungsaktivität von IRP-1 nach 24 h Ischämie vermindert ist und gleichzeitig die Expression von Ferritin im Verlauf von Ischämie und Reperfusion unverändert bleibt, ist durchaus möglich, zumal die Proteinsynthese in der frühen Phase der Reperfusion verlangsamt abläuft (Schiaffonati *et al.*, 1978). Außerdem muss eine Verminderung der IRP-Bindungsaktivität nicht unbedingt mit einer Induktion der Ferritinexpression einhergehen. Thomson *et al.* zeigten z.B., dass Stimulation von lactotrophen GH3 Zellen der Schilddrüse mit Thyrotropin Releasing Hormon sowohl zu einer Verminderung der IRP-Bindungsaktivität als auch zu einer Verringerung der Ferritinexpression führt (Thomson *et al.*, 2000). Ferritin scheint also auch unabhängig von IRPs posttranskriptionell reguliert werden zu können: In HepG2 Zellen kann das Zytokin IL-1 β Ferritin induzieren, wobei dieser Effekt allerdings nicht durch das Iron Responsive Element vermittelt wird, sondern wahrscheinlich eine andere, GC-reiche Region der Ferritin mRNA involviert ist (Rogers *et al.*, 1994).

4.2.1.2 Einfluss von ANP auf die IRP-1 Bindungsaktivität und die Ferritinexpression

Weder ein Einfluss von ANP auf die Eisenhomöostase der Zelle noch auf die Bindungsaktivität von IRPs oder auf die Ferritinsynthese wurde in der Literatur bisher beschrieben. Wir konnten zeigen, dass ANP bereits nach 30 min Perfusion die IRP-1 Bindungsaktivität senken kann. Nach 24 h Ischämie ist dieser Effekt nicht mehr nachweisbar, was daran liegen könnte, dass die Bindungsaktivität von IRP-1 auch in den Kontrollorganen nach der Ischämie vermindert ist. Gleichzeitig wird Ferritin bereits nach 30 min Perfusion induziert und ist auch nach 24 h Ischämie noch erhöht. Die Induktion von Ferritin erfolgt sehr schnell. Da Ferritin hauptsächlich posttranskriptionell reguliert wird, kann ein Anstieg des Ferritingehalts, z.B. nach Stimulation mit Eisen schnell detektiert werden (White und Munro, 1988). So konnten Berenshtein *et al.* zeigen, dass durch Ischämische Präkonditionierung im Herzen Ferritin bereits nach 25 min Ischämie auf das Doppelte ansteigt (Berenshtein *et al.*, 2002). Eine transkriptionelle Regulation der Ferritinexpression scheint nach solch kurzen

Zeiträumen eher unwahrscheinlich zu sein. Daher hängen die verringerte Bindungsaktivität von IRP-1 und die erhöhte Expression von Ferritin durch ANP-Präkonditionierung mit großer Wahrscheinlichkeit direkt zusammen.

ANP vermittelt die meisten Effekte über den Guanylatzyklase-gekoppelten NPR-A Rezeptor, wobei cGMP als second messenger entsteht (Levin *et al.*, 1998). Da die Perfusion mit dem cGMP-Analogon 8-Br-cGMP ebenfalls die IRP-1 Bindungsaktivität senken konnte, wird dieser ANP-Effekt wahrscheinlich über cGMP vermittelt. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass eine Induktion von Ferritin durch ANP an dessen Schutzwirkung beteiligt sein könnte, da die protektive Wirkung der hormonellen Präkonditionierung mit ANP ebenfalls über cGMP erfolgt (Gerbes *et al.*, 1998).

Eine Präkonditionierung mit ANP könnte durch Induktion von Ferritin zum Schutz vor IRS in der Leber beitragen, da Ferritin als Eisenspeicherprotein Eisen, das die Entstehung von ROS über die Fenton Reaktion katalysiert, abfängt und so vor oxidativem Stress schützt.

Gezeigt wurde bereits, dass ANP in der Lage ist, vor Kupfferzell-induziertem oxidativen Stress zu schützen (Bilzer *et al.*, 1999b). Möglicherweise spielt der Einfluss auf IRPs und Ferritin dabei eine Rolle.

ROS werden wahrscheinlich durch aktivierte Kupfferzellen nicht nur im Verlauf der Reperfusion gebildet. Inzwischen gibt es Hinweise, dass ROS auch schon während der Ischämie eine Rolle spielen. Rauen *et al.* konnten zeigen, dass Hypothermie in Hepatozyten und sinusoidalen Endothelzellen Apoptose auslösen kann und diskutieren, dass dies durch eine Erhöhung der intrazellulären Eisenspiegel und die Bildung von ROS vermittelt wird (Rauen *et al.*, 2000). ANP-Präkonditionierung schützt Hepatozyten in der isoliert perfundierten Rattenleber nach kalter Ischämie vor Apoptose (Gerwig *et al.*, in Revision) Dabei könnte aufgrund der Ergebnisse von Rauen *et al.* die Induktion von Ferritin eine Rolle spielen.

4.2.1.3 Zelluläre Lokalisation der ANP-Effekte

In isolierten Rattenhepatozyten konnte ANP weder die IRP-1 Bindungsaktivität senken noch die Ferritinexpression induzieren. Da aber die Hepatozyten den größten Teil der Leberzellen ausmachen, ist es am wahrscheinlichsten, dass die beschriebenen ANP-Effekte in diesen Zellen ausgelöst werden. Möglich wäre, dass ANP primär andere Leberzellen beeinflusst, z.B. Kupfferzellen oder auch Endothelzellen, die dann die Effekte über andere Signaltransduktionswege in Hepatozyten induzieren. In all diesen Zelltypen wurde die

mRNA-Expression des NPR-A Rezeptors nachgewiesen (Bilzer *et al.*, 1999b). Möglicherweise beeinflusst ANP auch in Kupfferzellen oder Endothelzellen direkt die IRP-1 Bindungsaktivität und die Ferritinexpression.

Um zu überprüfen, ob ANP die beschriebenen Effekte auf IRPs und Ferritin direkt in Kupfferzellen auslösen kann, müssten Versuche an isolierten Kupfferzellen durchgeführt werden. Da die Isolierung von Kupfferzellen jedoch sehr aufwendig ist und nur sehr geringe Ausbeuten erzielt werden, wurde dies nicht durchgeführt.

Ob Kupfferzellen bei der Verminderung der IRP-1 Bindungsaktivität und der Erhöhung der Ferritinexpression durch ANP eine Rolle spielen, lässt sich auch an Kupfferzell-depletierten Organen untersuchen, bei denen man zunächst gezielt die Kupfferzellen depletiert und anschließend untersucht, ob ANP die beschriebenen Effekte auf IRP-1 und Ferritin noch auslösen kann. Wir wählten dieses Modell für unsere Versuche. Die Depletion der Kupfferzellen erfolgte durch Injektion von Clodronat-haltigen Liposomen, die von den Kupfferzellen phagozytiert werden. Clodronat, ein anionisches Biphosphonat, wird dann in den Kupfferzellen freigesetzt und führt wahrscheinlich über eine Depletion von intrazellulärem Eisen (Van Rooijen, 1993; Mönkkönen und Heath, 1993) oder einen direkten Eingriff in den ATP-Metabolismus (Van Rooijen, 1993) zur Apoptose. Eine andere Methode zur Depletion von Kupfferzellen ist die systemische Gabe von Gadoliniumchlorid ($GdCl_3$). Wie diese Substanz genau wirkt, ist nicht bekannt. Neubauer *et al.* konnten zeigen, dass es durch $GdCl_3$ nicht zu einer Depletion der Kupfferzellen kommt, sondern zu einer temporären Blockade ihrer Aktivität (Neubauer *et al.*, 2002, abstract). Man diskutiert auch, dass es zu einer initialen Aktivierung der Kupfferzellen kommen kann. Da dies Auswirkungen auf zu untersuchende Effekte haben könnte, schien uns die Depletion der Kupfferzellen mittels Clodronat-haltiger Liposomen geeigneter zu sein.

In dieser Versuchsreihe konnte die Verminderung der IRP-1 Bindungsaktivität durch ANP jedoch schon in den Kontrollorganen, deren Kupfferzellen nicht depletiert worden waren, nicht reproduziert werden, so dass auch keine Aussagen über eine Beteiligung der Kupfferzellen gemacht werden konnte. Wir gehen davon aus, dass möglicherweise die Ethernarkose, unter der die Tiere die Liposomen bzw. 0,9% NaCl-Lösung injiziert bekommen, einen Einfluss auf den ANP-Effekt hat.

Der Nachweis einer Beteiligung von Kupfferzellen an den ANP-Effekten auf IRPs und Ferritin bleibt offen. Um zu untersuchen, ob Endothelzellen in die Verminderung der IRP-

Bindungsaktivität und die Erhöhung der Ferritinexpression involviert sind, müssten Versuche an isolierten Endothelzellen durchgeführt werden.

Wir vermuten jedoch, dass der Effekt der ANP-Präkonditionierung auf IRP-1 und Ferritin sehr wahrscheinlich in Hepatozyten induziert wird und dass dies von Kupfferzellen vermittelt wird. Es wurde bereits diskutiert, dass ANP über eine Beeinflussung der Kupfferzellen protektiv wirken könnte, da ANP in isolierten Kupfferzellen die LPS (Lipopolysaccharid)-induzierte Sekretion von TNF- α reduzieren kann (Kiemer *et al.*, 2002d). ANP verringert auch die Produktion von NO in Makrophagen (Kiemer und Vollmar, 1997).

4.2.1.4 Zusammenhang zur HO-1 Induktion

Um zu überprüfen, ob zwischen der HO-1 Induktion und den Effekten auf IRPs und Ferritin ein Zusammenhang besteht, wurden Perfusionen mit dem HO-1 Aktivitätshemmer Zinnprotoporphyrin (SnPP) durchgeführt. Protoporphyrine wie z.B. Zink- und Zinnprotoporphyrin sind dafür bekannt, dass sie die Aktivität der löslichen Guanylatzyklase inhibieren (Andersson und Grundemar, 1995). Somit könnten sie den ANP-Signaltransduktionsweg möglicherweise beeinflussen. Kiemer *et al.* konnten jedoch in der isoliert perfundierten Rattenleber zeigen, dass Zinkprotoporphyrin keinen Einfluss auf die ANP-induzierte cGMP-Bildung hat (Kiemer *et al.*, 2003).

Da die alleinige Perfusion mit SnPP keinen Einfluss auf die IRP-1 Bindungsaktivität hatte und SnPP die durch ANP ausgelöste Verminderung der RNA-Bindungsaktivität nicht aufheben konnte, ist dieser ANP-Effekt unabhängig von einer HO-1 Induktion. Bei den weiteren Versuchen bezüglich der HO-1 Induktion durch ANP-Präkonditionierung konnte dann auch gezeigt werden, dass HO-1 nur in Kupfferzellen induziert wird und dass dieser Effekt cGMP-unabhängig ist (Kiemer *et al.*, 2003). Da die Verringerung der IRP-1 Bindungsaktivität jedoch durch 8-Br-cGMP nachgeahmt werden konnte, ist dies ein weiterer Hinweis darauf, dass eine HO-1 Induktion bei den Effekten auf IRPs und Ferritin keine Rolle spielt.

4.2.1.5 Einfluss von ANP auf den Phosphorylierungsstatus von IRP-1

Die RNA-Bindungsaktivität der IRPs wird nicht nur über die Eisenspiegel der Zelle reguliert. Proteinkinase C (PKC) steigert in HL60-Zellen die IRP-Bindungsaktivität durch Phosphorylierung an Ser138 (Schalinske und Eisenstein, 1996). ANP seinerseits kann in isoliert perfundierten Lebern die membrangebundenen Formen der α - und ϵ -PKC signifikant erniedrigen (Kenngott *et al.*, 2001, abstract). ANP könnte also eine Phosphorylierung und

damit eine Aktivierung von IRP-1 verhindern, indem es die Aktivität der PKC inhibiert. Unsere Versuche zeigten jedoch, dass der Phosphorylierungsstatus von IRP-1 in den ANP-präkonditionierten Lebern und in den Kontrollorganen gleich ist. Somit scheint ANP die IRP-1 Bindungsaktivität auch nicht über eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus zu beeinflussen. Ob IRP-1 überhaupt -ähnlich wie in HL60-Zellen- auch in der Leber durch Phosphorylierung an Ser138 aktiviert werden kann, ist an dem Modell der isoliert perfundierten Rattenleber sehr schwer zu untersuchen. Eine Perfusion mit PKC-aktivierenden Substanzen wie z.B. PMA (Phorbolmyristatacetat) kann sehr viele andere Effekte auslösen. So ist PMA ein starker Aktivator von Kupfferzellen, was sich auf die Eisenhomöostase der Zelle auswirken könnte. Ergebnisse bezüglich des Phosphorylierungsstatus von IRP-1 könnten aus diesem Grund nicht eindeutig interpretiert werden.

Nun bleibt die Frage offen, wie ANP die IRP-1 Bindungsaktivität vermindert. Wir vermuten, dass ANP in Kupfferzellen die Bildung von ROS auslöst und darüber die RNA-Bindungsaktivität von IRP-1 beeinflusst. Dass ANP die Sekretion von ROS stimulieren kann, wurde bereits an polymorphkernigen Neutrophilen (Wiedermann *et al.*, 1992), an murinen Makrophagen (Vollmar *et al.*, 1997b) und an humanen Endothelzellen (Fürst *et al.*, 2003, abstract) gezeigt. Bezüglich einer Modulation der IRP-Bindungsaktivität durch oxidativen Stress gibt es ebenfalls eine Vielzahl von Veröffentlichungen: Cairo *et al.* konnten zeigen, dass in Rattenleberlysaten die gleichzeitige Generierung von H₂O₂ und Superoxid durch Inkubation mit Xanthinoxidase die IRP-Bindungsaktivität herabsetzen kann (Cairo *et al.*, 1996). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine *in vivo* Produktion von ROS, die durch Behandlung von Rattenlebern mit Phoron, einer Glutathion-depletierenden Substanz, ausgelöst wurde, sowohl die IRP-1 Bindungsaktivität senken als auch die Ferritinexpression induzieren kann (Cairo *et al.*, 1995).

4.2.2 PRÄKONDITIONIERUNG MIT ALPHA-LIPONSÄURE

Da α -Liponsäure eisenchelatierende Eigenschaften besitzt (Biewenga *et al.*, 1997; Packer, 1998), wurde in einem Modell der warmen Ischämie und Reperfusion untersucht, ob eine Präkonditionierung mit α -Liponsäure IRPs und Ferritin in der Rattenleber beeinflussen kann.

4.2.2.1 IRP-Bindungsaktivität im Verlauf von warmer Ischämie und Reperfusion

Anders als beim bereits beschriebenen Modell der kalten Ischämie und Reperfusion (siehe 4.2.1.1) bleibt die IRP-1 Bindungsaktivität im Verlauf von warmer Ischämie und Reperfusion

in den Kontrollorganen unverändert. Dies entspricht den Ergebnissen von Tacchini *et al.*, bei denen die RNA-Bindungsaktivität von IRP-1 in der Rattenleber nach 1 h Ischämie im Vergleich zu sham-operierten Tieren ebenfalls unverändert ist (Tacchini *et al.*, 1997). Allerdings konnte diese Arbeitsgruppe nach 1 h Reperfusion eine Abnahme der IRP-1 Aktivität beobachten, die im weiteren Verlauf jedoch wieder zurückging. Dies konnten wir zu den untersuchten Zeitpunkten (45 und 90 min Reperfusion) nicht feststellen, was wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Modelle zurückzuführen ist. Bei Tacchini *et al.* handelt es sich um einen *in vivo* Versuch. Letztendlich ist aber noch nicht genau bekannt, wie sich die Bindungsaktivität der IRPs durch Ischämie und Reperfusion verändert.

4.2.2.2 Reduktion der IRP-Bindungsaktivität durch α -Liponsäure

Aufgrund der eisenchelatierenden Eigenschaften von α -Liponsäure hatten wir erwartet, dass die IRP-Bindungsaktivität von IRP-1 in den präkonditionierten Organen steigt. Wir konnten jedoch zeigen, dass α -Liponsäure bereits nach 30 min Perfusion die IRP-1 Bindungsaktivität senkt und dass dieser Effekt auch noch nach 1 h Ischämie erhalten bleibt. Aus diesem Grund haben wir die Ferritinexpression genauer betrachtet. Doch eine Präkonditionierung mit α -Liponsäure hatte keinen Einfluss auf die Protein-Level von Ferritin.

Somit scheint α -Liponsäure in der isoliert perfundierten Rattenleber nicht über eine Induktion der Ferritinexpression am Schutz vor IRS beteiligt zu sein. Bisher gibt es in der Literatur nur eine Arbeit von Goralska *et al.*, die zeigt, dass α -Liponsäure in Epithelzellen des Auges eine Anreicherung von Ferritin bewirkt. Dies wird jedoch vermutlich nicht durch eine erhöhte Neusynthese von Ferritin, sondern durch eine verlangsamte Degradation erreicht (Goralska *et al.*, 2003). Diese Arbeitsgruppe konnte außerdem nachweisen, dass eine Behandlung der Zellen mit α -Liponsäure vor oxidativem Stress durch H_2O_2 schützen kann. All diese Effekte wurden aber erst nach 20 h Stimulation mit α -Liponsäure beobachtet. Dies ist im Vergleich zu unserem Modell ein sehr langer Zeitraum.

Dass eine Verminderung der IRP-Bindungsaktivität nicht unbedingt mit einer Erhöhung der Ferritinexpression einhergehen muss, wurde bereits erwähnt (siehe 4.2.1.1).

Als nächstes stellt sich die Frage, ob ein alleiniger Effekt auf die IRP-1 Bindungsaktivität auch protektiv wirken kann. Wir vermuten, dass durch Verminderung der RNA-Bindungsaktivität IRP-1 vermehrt als zytosolische Aconitase vorliegt. In dieser Konformation weist IRP-1 eine hohe Homologie zur mitochondrialen Aconitase auf und könnte an der vermehrten Umsetzung von Citrat beteiligt sein. Dabei entsteht letztendlich ATP. Dies könnte

ein Hinweis darauf sein, wie α -Liponsäure den ATP-Gehalt im Verlauf von Ischämie und Reperfusion erhöhen kann (Müller, 2002). Präkonditionierung mit α -Liponsäure könnte also durch Steigerung der Aconitase-Aktivität von IRP-1 der ATP-Depletion, die während der Ischämie auftritt, entgegenwirken und so die Energiebereitstellung in der Leber verbessern. Frau S. Kulhanek-Heinze (Department Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München) wird dazu weitere Versuche durchführen.

Offen bleibt auch, wie α -Liponsäure die RNA-Bindungsaktivität von IRP-1 beeinflussen kann. *In vitro* wurde gezeigt, dass Dihydroliponsäure, die im Körper durch Reduktion von α -Liponsäure entsteht, Eisen aus Ferritin freisetzen kann (Bonomi *et al.*, 1989). Dies könnte die IRP-Bindungsaktivität herabsetzen. Goralska *et al.* beobachteten dagegen, dass α -Liponsäure in Epithelzellen des Auges den intrazellulären Eisenspiegel erniedrigt, indem es die Aufnahme von Eisen in die Zelle verringert und gleichzeitig die Speicherung von Eisen induziert (Goralska *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Daten würde man wiederum eine Erhöhung der IRP-Bindungsaktivität erwarten. Um Hinweise darüber zu erhalten, ob α -Liponsäure in unserem Modell die intrazellulären Eisenspiegel beeinflusst, wird Frau S. Kulhanek-Heinze (Department Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München) eine Eisenmessung in isolierten Hepatozyten nach α -Liponsäure-Stimulation durchführen.

Denkbar ist auch, dass α -Liponsäure in unserem Modell die IRP-Bindungsaktivität gar nicht über Eisenspiegel reguliert, sondern eine direkte Wirkung auf die Clusterbildung hat. Es ist noch weitgehend unbekannt, welche Faktoren außer Eisen die Ausbildung des Eisen-Schwefel-Clusters von IRP-1 begünstigen bzw. welche zu einer Zerstörung dieser Struktur führen und somit die RNA-Bindungsaktivität von IRP-1 erhöhen. Allerdings scheinen nicht nur die Eisenspiegel der Zelle einen Einfluss darauf zu haben, ob IRP-1 überwiegend als IRE-bindendes Protein oder als zytosolische Aconitase mit einem Eisen-Schwefel-Cluster vorliegt. So bewirken H_2O_2 und NO wahrscheinlich über eine Zerstörung der Clusterstruktur eine Erhöhung der IRP-1 Bindungsaktivität (Paraskeva und Hentze, 1996). Auch starke Reduktionsmittel wie z.B. 2-Mercaptoethanol, können die IRP-1 vollständig aktivieren (Hentze *et al.*, 1989).

4.2.3 ISCHÄMISCHE PRÄKONDITIONIERUNG

Eine Induktion von Ferritin als möglicher protektiver Mechanismus der Ischämischen Präkonditionierung wurde bisher nur im Herzen beschrieben. Berenshtein *et al.* zeigten, dass in präkonditionierten Organen **nach** der Ischämie weniger freies, redoxaktives Eisen, das an

der Entstehung von ROS über die Fenton Reaktion beteiligt ist, freigesetzt wird und dass die Ferritinlevel fast doppelt so hoch sind (Berenshtein *et al.*, 2002). Da bei diesen Versuchen **während** der Ischämischen Präkonditionierung (3 x 2 min Ischämie und 3 min Reperfusion) geringe, aber signifikante Mengen an Eisen freigesetzt wurden, wird postuliert, dass dieses freigesetzte Eisen die Synthese von Ferritin induzieren kann und so zum Schutz vor IRS beiträgt. In unserem Modell waren die Ferritinlevel kurz nach der Ischämischen Präkonditionierung im Vergleich zur Kontrollgruppe bereits signifikant erhöht, dieser Effekt war auch nach 1 h Ischämie noch zu sehen. Möglich wäre, dass dies auch über eine Erhöhung der Eisenspiegel vermittelt wird. Zumindest ist es sehr wahrscheinlich, dass die schnelle Induktion von Ferritin durch eine verstärkte Translation und nicht durch eine erhöhte Transkription erfolgt. Außerdem scheint der unmittelbare Schutz durch Ischämische Präkonditionierung auf posttranskriptioneller Ebene vermittelt zu werden, da der protektive Effekt nur durch Cycloheximid, nicht aber durch Aktinomycin D aufgehoben wird (Rowland *et al.*, 1997).

Als Maß für die intrazellulären Eisenspiegel kann die RNA-Bindungsaktivität von IRP-1 herangezogen werden, das bei hohen Eisenspiegeln überwiegend als zytosolische Aconitase vorliegt und somit weder an das IRE in der Ferritin mRNA bindet noch dessen Translation inhibiert. Die IRP-1 Bindungsaktivität war kurz nach der Ischämischen Präkonditionierung tendenziell gesenkt. Somit könnte also die Ferritinsynthese auch in der Leber über eine Veränderung der Eisenspiegel induziert werden, die ihrerseits IRP-1 beeinflussen.

Die Induktion von Ferritin in der Leber nach Ischämischer Präkonditionierung wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt. Dies könnte zum Schutz vor IRS erheblich beitragen, da Ferritin Eisen speichern kann. Eisen kann dann nicht mehr die Entstehung von ROS über die Fenton Reaktion katalysieren. Dass Eisen tatsächlich zum Schaden nach Ischämie und Reperfusion beiträgt, wurde bereits durch Perfusionen mit Eisenchelatoren gezeigt, die den Schaden nach Ischämie und Reperfusion verringern konnten (Omar *et al.*, 1989; Colet *et al.*, 1996; Amersi *et al.*, 2001).

4.3 EINFLUSS VON ANP AUF DIE EXPRESSION VON GAPDH

4.3.1 GAPDH mRNA-EXPRESSION MITTELS RT-PCR

In einem herkömmlichen RT-PCR Experiment mit GAPDH-spezifischen Primern war in den ANP-präkonditionierten Lebern eine deutliche Reduktion der GAPDH mRNA-Expression nach 24 h kalter Ischämie sowie nach 45 und 120 min Reperfusion zu sehen. Die hier angewendete Methode der RT-PCR erlaubt jedoch nur eine semiquantitative Aussage und ist lediglich ein Hinweis auf eine mögliche Reduktion der GAPDH mRNA-Expression durch ANP, da weder ein externer noch ein interner Standard zur Quantifizierung verwendet wurde. Ein externer Standard ist generell ungeeignet, da interne Störungen der Amplifikationseffizienz einer individuellen Probe nicht zu erkennen sind. Im Gegensatz dazu ermöglichen interne Standards die Erfassung von inhibitorisch wirksamen Substanzen, allerdings nur sofern diese auf beide PCRs denselben Einfluss haben und nicht sequenzspezifisch wirken. Ein weiteres großes Problem ist die enorme Varianz der Reversen Transkription, insbesondere dann, wenn aus zwei unterschiedlichen RNAs cDNA synthetisiert wird. Aus diesen Gründen wählten wir zur genaueren Quantifizierung der GAPDH mRNA-Menge eine andere Methode.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, mRNA zu quantifizieren. Die wichtigsten sind Northern Blot, Ribonuklease-Protection-Assay, kompetitive PCR und Real-Time PCR.

Beim **Northern Blot** wird die RNA zunächst unter denaturierenden Bedingungen auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und anschließend mit einer radioaktiv-markierten RNA- oder DNA-Sonde, die komplementär zu der zu untersuchenden mRNA ist, inkubiert und mit einem Phosphoimager detektiert. Ein großer Vorteil des Northern Blots im Vergleich zu den anderen Methoden ist die relativ einfache und problemlose Durchführung. Nachteilig ist, dass sehr große Mengen an Ausgangsmaterial benötigt werden und die Methode daher nicht sehr sensitiv ist. Außerdem können beim Transfer der RNA auf die Membran Ungleichmäßigkeiten auftreten, da die Bloteffizienz nicht an allen Stellen der Membran gleich ist.

Beim **Ribonuklease-Protection-Assay** wird die isolierte RNA ebenfalls mit einer zur gesuchten RNA komplementären, radioaktiv-markierten RNA-Sonde hybridisiert. Die aus der Hybridisierung hervorgegangenen, perfekt gepaarten RNA-RNA-Hybridmoleküle werden

anschließend mit einem Gemisch aus den Ribonukleasen A und T1 inkubiert, die spezifisch einzelsträngige RNA hydrolysieren. Somit werden alle nicht zur Ribosonde homologen RNAs, einzelsträngige Überhänge und freie, ungebundene Sonden-RNA verdaut. Die Hybride werden danach in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, autoradiographiert und quantifiziert. Diese Methode ist ca. 20-100 mal sensitiver als die Northern Blot Methode.

Bei der **kompetitiven PCR** wird dem Reaktionsansatz ein artifizieller klonierter Standard in bekannten Ausgangskonzentrationen zugesetzt. Da dieser mit denselben Primern wie die Zielsequenz koamplifiziert wird und somit das eigentliche Target „mimt“, wird er auch als Mimic-Fragment bezeichnet und die Reaktion als kompetitive PCR, da es zu einer Konkurrenz beider Targets um die Primer kommt. Nach der Amplifizierung werden beide Produkte entweder aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe oder durch eine unterschiedliche Restriktionsstelle voneinander getrennt und analysiert. Beide Signale werden gegen die Ausgangskonzentration des RNA-Mimic-Fragments aufgetragen und am Schnittpunkt beider Kurven, d.h. bei gleicher Menge des Endprodukts, wird die Ausgangsmenge der Probe abgelesen. Vorteil dieser Methode ist die sehr hohe Sensitivität, Nachteil der sehr hohe Optimierungsaufwand.

Die Grundlagen der **Real-Time PCR** wurden bereits in der Einleitung dargestellt.

Wir entschieden uns für die Real-Time PCR, da die PCR an sich die sensitivste Methode von allen beschriebenen ist und die Real-Time PCR im besonderen auch die bereits erwähnte Problematik der Endpunktsbestimmung umgeht, da während der PCR-Reaktion permanent die Menge an entstandenem Produkt gemessen und aufgezeichnet wird und somit Expressionsunterschiede des zu untersuchenden Gens zwischen zwei Proben im exponentiellen Bereich der PCR-Reaktion bestimmt werden und nicht in der Plateauphase. Außerdem können Effizienzunterschiede zwischen dem Target und dem verwendeten Standard genau bestimmt werden und gehen in die Quantifizierung mit ein.

4.3.2 GAPDH mRNA-EXPRESSION MITTELS REAL-TIME PCR

Die GAPDH-Expression wurde sowohl mit der SYBR[®] Green-Methode als auch unter Verwendung einer spezifischen TaqMan[®] Sonde ermittelt. Die erhaltenen Ergebnisse waren jedoch sehr unterschiedlich. Dafür kann es verschiedene Gründe geben:

Eine Verunreinigung durch genomische DNA und damit eine Verfälschung der Ergebnisse wurde in beiden Fällen ausgeschlossen, bei der SYBR[®] Green-Methode durch

vorangeschalteten DNase-Verdau, bei der TaqMan[®]-Methode durch Kontroll-PCR-Reaktionen ohne vorangegangene Reverse Transkription. Dass die verwendeten Primer an andere Sequenzen als die GAPDH mRNA binden und somit Konkurrenzreaktionen auftreten, wurde durch eine Suche in BLAST[®] (Basic Local Alignment Search Tool) ebenfalls ausgeschlossen.

Möglich wäre jedoch hinsichtlich der neu beschriebenen Funktionen von GAPDH auch, dass es mehrere, verschiedene GAPDH mRNAs gibt, an die die eingesetzten Primer unterschiedlich binden. Bisher wurde z.B. noch eine GAPDH mRNA Typ-2 in Rattenhoden identifiziert (McLaughlin und Hall, nicht veröffentlicht). Hinzu kommt, dass das GAPDH-Gen sehr komplex organisiert ist, allein in der Ratte wurden bisher mehr als 200 Sequenzen identifiziert (Sirover, 1999). Man geht zwar davon aus, dass es sich hauptsächlich um Pseudogene handelt und nur ein aktives Gen für GAPDH existiert, doch weiß man noch zu wenig darüber, um eine definitive Aussage treffen zu können. Das Vorliegen von Pseudogenen stört generell die PCR-Reaktion, da sie um die Primer konkurrieren. In unseren Versuchen dürfte das jedoch keine Rolle spielen, da genomische Verunreinigungen weitgehend ausgeschlossen wurden. Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte in der verwendeten Stückzahl liegen. Bei der SYBR[®] Green-Methode wurden lediglich zwei voneinander unabhängige Experimente mit n=3 pro untersuchter Gruppe durchgeführt, während bei der TaqMan[®]-Methode mit jeweils n=4-5 gearbeitet wurde. Die relativ geringen Expressionsunterschiede konnten bei höherer Stückzahl nicht mehr detektiert werden. Eine andere Erklärung könnte in einer starken Varianz der Reversen Transkription liegen, da für die beiden PCR-Methoden jeweils neu isolierte RNA mit verschiedenen Methoden revers transkribiert wurde.

Alles in allem wiesen jedoch zwei der verwendeten Methoden auf eine Reduktion der GAPDH mRNA-Expression durch Präkonditionierung mit ANP hin. Die Reduktion bewegte sich in einer Größenordnung von max. 40%. Da GAPDH bis zu 10% der Gesamtproteinmenge in der Zelle ausmacht (Sirover, 1999), könnten selbst diese geringen Unterschiede eine sehr große Wirkung haben. Allerdings gibt es bisher keine Methode der mRNA-Quantifizierung, die Unterschiede, die kleiner als 100% sind, zuverlässig und reproduzierbar detektieren kann.

4.3.3 GAPDH PROTEINEXPRESSION

Im Western Blot konnten keine Unterschiede in der GAPDH-Proteinexpression zwischen Kontrollorganen und ANP-präkonditionierten Organen festgestellt werden. Dennoch schließt dieser Befund nicht aus, dass GAPDH in unserem Modell der isoliert perfundierten Rattenleber eine der neu beschriebenen Funktionen ausübt und beispielsweise in den Zellkern transloziert und an der Auslösung von Apoptose beteiligt ist. Eine subzelluläre Fraktionierung mit anschließender Bestimmung der GAPDH Proteinmengen gibt darüber wahrscheinlich größeren Aufschluss. Allerdings stößt man hier auf methodische Grenzen, da man sehr reine Kernextrakte gewinnen müsste, die keinerlei Verunreinigung von zytosolischem GAPDH aufweisen. Herr Dr. H. Meißner (Institut für Pathologie, Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München) versuchte daher, eine zelluläre Translokation in Gewebeschnitten der Lebern nachzuweisen. Leider erhielt er mit dem einzig kommerziell erhältlichen Antikörper keine auswertbaren Ergebnisse, da u.a. unspezifische Reaktionen auftraten.

Somit können keine Aussagen getroffen werden, ob GAPDH auch im Verlauf von Ischämie und Reperfusion reguliert wird und evtl. an der Auslösung von Apoptose beteiligt ist.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mögliche molekulare Wirkmechanismen pharmakologischer und ischämischer Präkonditionierung zur Prävention des Ischämie-Reperfusionsschadens am Modell der Rattenleber untersucht. Im Mittelpunkt stand dabei der Einfluss dieser Therapieansätze auf das Eisenregulierende Protein IRP-1 und das zytoprotektiv wirkende Eisenspeicherprotein Ferritin sowie auf die Aktivität von Matrix Metalloproteinasen, die vor allem an der Ablösung der sinusoidalen Endothelzellen von der sie umgebenden Matrix beteiligt sind. Außerdem wurde die Rolle von GAPDH, einem Schlüsselenzym der Glykolyse, beim IRS genauer betrachtet.

Hormonelle Präkonditionierung mit dem Atrialen Natriuretischen Peptid verringerte die RNA-Bindungsaktivität von IRP-1. Dieser Effekt wird wahrscheinlich über cGMP vermittelt und ist unabhängig von einer HO-1 Induktion. Die Regulation der RNA-Bindungsaktivität erfolgt nicht über eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus von IRP-1, sondern wird vermutlich über ROS vermittelt, die möglicherweise von Kupferzellen gebildet werden. ANP war außerdem in der Lage, die Ferritinexpression zu induzieren. Dies ist wahrscheinlich eine Folge der verminderten IRP-1 Bindungsaktivität und einer daraus resultierenden Erhöhung der Ferritintranslation.

Die Aktivität von Matrix Metalloproteinasen wird durch Präkonditionierung mit ANP nicht beeinflusst.

Bei den Untersuchungen zu GAPDH wiesen zwei der verwendeten Methoden zur mRNA-Quantifizierung auf eine Reduktion der GAPDH mRNA-Expression durch ANP hin und lassen eine neuartige Rolle von GAPDH beim IRS vermuten, z.B. eine Beteiligung an der Auslösung von Apoptose. Da die Reduktion der GAPDH mRNA-Menge sich in einer Größenordnung von ca. 40% bewegte und es bisher keine Methode der mRNA-Quantifizierung gibt, die diese relativ geringen Unterschiede zuverlässig und reproduzierbar detektieren kann, konnten wir aufgrund methodischer Grenzen keine eindeutige Aussage bezüglich einer Reduktion der GAPDH mRNA-Expression durch ANP treffen. Die GAPDH Proteinmenge blieb unverändert.

Präkonditionierung mit α -Liponsäure führte ebenfalls zu einer Reduktion der IRP-1 Bindungsaktivität. Folglich liegt IRP-1 wahrscheinlich überwiegend als zytosolische Aconitase vor und könnte aufgrund der hohen Homologie zur mitochondrialen Aconitase an einer vermehrten Umsetzung von Citrat im Citratzyklus beteiligt sein. Dies ist vermutlich ein Hinweis darauf, wie α -Liponsäure den ATP-Gehalt in den Zellen erhöhen und so die Energiebereitstellung in der Leber verbessern kann. Auf die Ferritinexpression hatte die Präkonditionierung mit α -Liponsäure keinen Einfluss.

Ischämische Präkonditionierung hatte eine deutliche Induktion der Ferritinexpression zur Folge, was zum Schutz vor IRS erheblich beitragen könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen neue Hinweise zum molekularen Wirkmechanismus verschiedener Therapieansätze zum Schutz vor IRS geben. Diese Kenntnisse sind eine wichtige Voraussetzung für deren sinnvolle und rationale Anwendung in der Klinik.

6 ANHANG

6.1 ABKÜRZUNGEN

% (m/V)	Massenprozent
% (V/V)	Volumenprozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
8-Br-cGMP	8-Bromoguanin-3', 5'-zyklisches Monophosphat
A	Ampere
Å	Angström
abs.	absolut
AMV-RT	Aviärer Myeloblastosis Virus-Reverse Transkriptase
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
AP-1	Aktivator Protein-1
APMA	4-Aminophenylquecksilberacetat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BNP	Brain oder B-Typ Natriuretisches Peptid
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
cAMP	zyklisches Adenosin-3', 5'-monophosphat
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosin-3', 5'-monophosphat
Ci	Curie
Cl ₂ MBP	Clodronat
CNP	C-Typ Natriuretisches Peptid
COX-2	Cyclooxygenase-2
cpm	Zähler pro Minute (counts per minute)
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure

CTP	Cytosin-5'-triphosphat
Cys	Cystein
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DNP	<i>Dendroaspis</i> Natriuretisches Peptid
dNTP	dATP, dCTP, dGTP oder dTTP
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eALAS	5-Aminolävulinatsynthase
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ET-1	Endothelin-1
EtBr	Ethidiumbromid
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GC	Guanylatzyklase
GDP	Glyoxal-DMSO-Phosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
HBSS	Hank's Salzlösung (Hank's balanced salt solution)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HO-1	Hämoxygenase-1
IGF-1	insulin growth factor-1
IgG	Immunglobulin G

IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP	Ischämische Präkonditionierung
IP3	Inositoltriphosphat
IRE	Iron Responsive Element
IRP	Eisenregulierendes Protein (iron regulatory protein)
IRS	Ischämie-Reperfusionsschaden/-schäden
IκB	inhibierender Faktor-κB
kb	Kilobasen
KC	Kupfferzellen
KH-Puffer	Krebs-Henseleit Puffer
Ko	Kontrolle
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
LS	α-Liponsäure
m	Milli (10 ⁻³) oder Meter
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minute
MMP	Matrix Metalloproteinase
Mn-SOD	Mangan-Superoxiddismutase
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MT-MMP	membrane-type MMP
n	Nano (10 ⁻⁹)
N	Normal
NF-κB	Nukleärer Faktor-κB
NP	Natriuretische Peptide
NPR	Natriuretischer Peptidrezeptor
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor

PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglycol
pH	potentia Hydrogenii
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositolbiposphat
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
REMSA	RNA Electrophoretic Mobility Shift Assay
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
Ser	Serin
SMC	glatte Muskelzellen (smooth muscle cells)
SnPP	Zinnprotoporphyrin
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBS-T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor

TIMP	tissue inhibitor of matrix metalloproteinase
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
totRNA	totale RNA
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UTR	nichttranslatierte Region (untranslated region)
UV	Ultraviolett
UW-Lösung	University of Wisconsin-Lösung
V	Volt

6.2 ALPHABETISCHE LISTE DER FIRMEN

AG Hoechst Pharma	Frankfurt/Main
Agfa-Gevaert AG	München
Alexis Biochemicals	Lausen, Schweiz
Amersham Pharmacia Biotech	Uppsala, Schweden
ASTA Medica	Frankfurt/Main
Bandelin Electronic GmbH	Berlin
BD Labware	Bedford, MA, USA
Beckmann Instruments	Irvine, CA, USA
Biometra	Göttingen
BioRad	München
BioWhittaker Molecular Applications	Rockland, ME, USA
Biozol Diagnostika Vertrieb GmbH	Eching
Boehringer Mannheim	Mannheim
Braun Melsungen AG	Melsungen
Calbiochem	Schwalbach
Canberra-Packard GmbH	Dreieich
Cell Signaling	Frankfurt/Main
Charles-River Wiga GmbH	Sulzfeld
Chemicon International Inc.	Temecula, CA, USA
DuPont Pharma GmbH	Bad Homburg
Eastman Kodak Company	Rochester, NY, USA
Epson	Chatswood, NSW, Australien
Fuji Photo Film GmbH	Düsseldorf
Gibco/Invitrogen	Karlsruhe
GraphPad Software Inc.	San Diego, CA, USA
Heraeus	Hanau
Ika Labor Technik	Staufen
Jackson ImmunoResearch Laboratories	West Grove, PA, USA
Linde	Unterschleißheim
MBI Fermentas	St. Leon Roth

Merial	Hallbergmoos
Millipore	Bedford, MA, USA
MWG Biotech	Ebersberg
NEN Life Science Products	Köln
Owl Separation Systems	Porthsmouth, NH, USA
PAN Biotech GmbH	Aidenbach
PE Applied Biosystems	Weiterstadt
PerkinElmer Instruments	Überlingen
Peske	Aindling-Pichl
Promega	Heidelberg
Qiagen GmbH	Hilden
Roche Diagnostics	Mannheim
Roth	Karlsruhe
Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg
Savant Instruments	Holbrook, NY, USA
Serva	Heidelberg
Sigma	Taufkirchen
Sorvall Kendro Laboratory Products GmbH	Hamburg
Ssniff Spezialdiäten GmbH	Soest
Stratagene	Heidelberg
Uniequip	Martinsried

6.3 VERÖFFENTLICHUNGEN

Poster:

Anke C. Förnges, Tobias Gerwig, Angelika M. Vollmar, Alexandra K. Kiemer

Protection against Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury by ANP Preconditioning is not mediated by Inhibition of Matrix Metalloproteinases

Naunyn-Schmiedeberg's Arch of Pharmacol 2002, 365 (Supplement 1): Abstract Nr. 391

43. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz

Anke C. Förnges, Alexandra K. Kiemer, Tobias Gerwig, Alexander L. Gerbes, Angelika M. Vollmar

ANP Preconditioning attenuates RNA-Binding Activity of Iron Regulatory Protein-1 during Hepatic Ischemia-Reperfusion independent of HO-1 Induction

Naunyn-Schmiedeberg's Arch of Pharmacol 2003, 367 (Supplement 1): Abstract Nr. 412

44. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz

Originalpublikationen:

A. K. Kiemer, A. C. Förnges, S. Kenngott, U. Beuers, T. Gerwig, M. Bilzer, A. L. Gerbes, A. M. Vollmar

ANP induces hepatic ferritin expression *via* regulation of iron regulatory protein activation – role of PKC and HO-1

in Vorbereitung

7 LITERATURVERZEICHNIS

Amersi F., Buelow R, Kato H, Ke B, Coito AJ, Shen XD et al. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J.Clin.Invest.* 1999;104:1631-1639

Amersi F., Dulkanchainun T, Nelson SK, Farmer DG, Kato H, Zaky J et al. A novel iron chelator in combination with a P-selectin antagonist prevents ischemia/reperfusion injury in a rat liver model. *Transplantation* 2001;71:112-118

Arai M., Thurman RG, Lemasters JJ. Involvement of Kupffer cells and sinusoidal endothelial cells in ischemic preconditioning to rat livers stored for transplantation. *Transplant.Proc.* 1999;31:425-427

Arora A. S., Gores GJ. The role of metals in ischemia/reperfusion injury of the liver. *Semin.Liver Dis.* 1996;16:31-38

Arosio P., Yokota M, Drysdale JW. Structural and immunological relationships of isoferritins in normal and malignant cells. *Cancer Res.* 1976;36:1735-1739

Arthur M. J., Friedman SL, Roll FJ, Bissell DM. Lipocytes from normal rat liver release a neutral metalloproteinase that degrades basement membrane (type IV) collagen. *J.Clin.Invest.* 1989;84:1076-1085

Becker J., Craig EA. Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur.J.Biochem.* 1994;219:11-23

Berenshtein E., Vaisman B, Goldberg-Langerman C, Kitrossky N, Konijn AM, Chevion M. Roles of ferritin and iron in ischemic preconditioning of the heart. *Mol.Cell Biochem.* 2002;234-235:283-292

Bevilacqua M. A., Faniello MC, Russo T, Cimino F, Costanzo F. Transcriptional regulation of the human H ferritin-encoding gene (FERH) in G418-treated cells: role of the B-box-binding factor. *Gene* 1994;141:287-291

Biewenga G. P., Bast A. Reaction of lipoic acid with ebselen and hypochlorous acid. *Methods Enzymol.* 1995;251:303-314

Biewenga G. P., Haenen GR, Bast A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen.Pharmacol.* 1997;29:315-331

Bilzer M., Witthaut R, Paumgartner G, Gerbes AL. Prevention of ischemia/reperfusion injury in the rat liver by atrial natriuretic peptide. *Gastroenterology* 1994;106:143-151

Bilzer M., Paumgartner G, Gerbes AL. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after hypothermic preservation. *Gastroenterology* 1999a;117:200-210

Bilzer M., Jaeschke H, Vollmar AM, Paumgartner G, Gerbes AL. Prevention of Kupffer cell-induced oxidant injury in rat liver by atrial natriuretic peptide. *Am.J.Physiol.* 1999b;276:G1137-G1144

Bilzer M., Gerbes AL. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J.Hepatol.* 2000;32:508-515

Birnboim H. C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979;7:1513-1523

Blankensteijn J. D., Terpstra OT. Liver preservation: the past and the future. *Hepatology* 1991;13:1235-1250

Bludovska M., Kotyzova D, Koutensky J, Eybl V. The influence of alpha-lipoic acid on the toxicity of cadmium. *Gen.Physiol Biophys.* 1999;18 Spec No:28-32

Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ.Res.* 2000;87:972-983

Bonkovsky H. L. Iron and the liver. *Am.J.Med.Sci.* 1991;301:32-43

Bonomi F., Cerioli A, Pagani S. Molecular aspects of the removal of ferritin-bound iron by DL-dihydrolipoate. *Biochim.Biophys.Acta* 1989;994:180-186

- Bustamante J., Lodge JK, Marcocci L, Tritschler HJ, Packer L, Rihn BH.** Alpha-lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free Radic.Biol.Med.* 1998;24:1023-1039
- Bustin S. A.** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J.Mol.Endocrinol.* 2000;25:169-193
- Bustin S. A.** Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J.Mol.Endocrinol.* 2002;29:23-39
- Cairo G., Tacchini L, Pogliaghi G, Anzon E, Tomasi A, Bernelli-Zazzera A.** Induction of ferritin synthesis by oxidative stress. Transcriptional and post-transcriptional regulation by expansion of the "free" iron pool. *J.Biol.Chem.* 1995;270:700-703
- Cairo G., Castrusini E, Minotti G, Bernelli-Zazzera A.** Superoxide and hydrogen peroxide-dependent inhibition of iron regulatory protein activity: a protective stratagem against oxidative injury. *FASEB J.* 1996;10:1326-1335
- Cairo G., Pietrangelo A.** Iron regulatory proteins in pathobiology. *Biochem.J.* 2000;352 Pt 2:241-250
- Cairo G., Recalcati S, Pietrangelo A, Minotti G.** The iron regulatory proteins: targets and modulators of free radical reactions and oxidative damage(1,2). *Free Radic.Biol.Med.* 2002;32:1237-1243
- Caldwell-Kenkel J. C., Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ.** Reperfusion injury to endothelial cells following cold ischemic storage of rat livers. *Hepatology* 1989;10:292-299
- Calmus Y., Cynober L, Dousset B, Lim SK, Soubrane O, Conti F et al.** Evidence for the detrimental role of proteolysis during liver preservation in humans. *Gastroenterology* 1995;108:1510-1516

Carini R., De Cesaris MG, Splendore R, Vay D, Domenicotti C, Nitti MP et al. Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. *Hepatology* 2001;33:131-139

Carini R., De Cesaris MG, Splendore R, Domenicotti C, Nitti MP, Pronzato MA et al. Mechanisms of hepatocyte protection against hypoxic injury by atrial natriuretic peptide. *Hepatology* 2003;37:277-285

Carlile G. W., Chalmers-Redman RM, Tatton NA, Pong A, Borden KE, Tatton WG. Reduced apoptosis after nerve growth factor and serum withdrawal: conversion of tetrameric glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to a dimer. *Mol.Pharmacol.* 2000;57:2-12

Carroll R., Yellon DM. Myocardial adaptation to ischaemia--the preconditioning phenomenon. *Int.J.Cardiol.* 1999;68 Suppl 1:S93-101

Caskey J. H., Jones C, Miller YE, Seligman PA. Human ferritin gene is assigned to chromosome 19. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1983;80:482-486

Chau I., Rigg A, Cunningham D. Matrix metalloproteinase inhibitors-an emphasis on gastrointestinal malignancies. *Crit.Rev.Oncol.Hematol.* 2003;45:151-176

Chen R. W., Saunders PA, Wei H, Li Z, Seth P, Chuang DM. Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and p53 in neuronal apoptosis: evidence that GAPDH is upregulated by p53. *J.Neurosci.* 1999;19:9654-9662

Chirgwin J. M., Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979;18:5294-5299

Clark J. E., Foresti R, Sarathchandra P, Kaur H, Green CJ, Motterlini R. Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* 2000;278:H643-H651

Clavien P. A., Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 1992;53:957-978

Cohen M. R., Turco S., Davis N.M. Amanita (Phalloides Group) Mushroom Poisoning. Treatment Methods Including Use of Thiocetic Acid. *Drug Intell.Clin.Pharmacol.* 1971;5:207-209

Cohen M. V., Baines CP, Downey JM. Ischemic preconditioning: from adenosine receptor of KATP channel. *Annu.Rev.Physiol.* 2000;62:79-109

Coleman M. D., Eason RC, Bailey CJ. The therapeutic use of lipoic acid in diabetes: a current perspective. *Environm.Tox.Pharmacol.* 2001;10:167-172

Colet J. M., Cetiner E, Hedlund BE, Muller RN. Assessment of microvascular integrity in the isolated perfused rat liver by contrast-enhanced MRI. Attenuation of reperfusion injury by conjugated deferoxamine. *Magn.Reson.Med.* 1996;36:753-757

Colletti L. M., Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA, Jr. Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J.Clin.Invest.* 1990;85:1936-1943

Coluccidamato L. G., Ursini MV, Colletta G, Cirafici A, Defrancisicis V. Thyrotropin stimulates transcription from the ferritin heavy chain promoter. *Biochem.Biophys. Res.Commun.* 1989;165:506-511

Cornwell T. L., Arnold E, Boerth NJ, Lincoln TM. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am.J.Physiol.* 1994;267:C1405-C1413

Currie M. G., Geller DM, Cole BR, Siegel NR, Fok KF, Adams SP et al. Purification and sequence analysis of bioactive atrial peptides (atriopeptins). *Science* 1984;223:67-69

Cursio R., Mari B, Louis K, Rostagno P, Saint-Paul MC, Giudicelli J et al. Rat liver injury after normothermic ischemia is prevented by a phosphinic matrix metalloproteinase inhibitor. *FASEB J.* 2002;16:93-95

de Bold A. J., Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci.* 1981;28:89-94

de Bold A. J. Tissue fractionation studies on the relationship between an atrial natriuretic factor and specific atrial granules. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 1982;60:324-330

de Bold A. J. Atrial natriuretic factor: a hormone produced by the heart. *Science* 1985;230:767-770

de Groot H., Brecht M. Reoxygenation injury in rat hepatocytes: mediation by O₂/H₂O₂ liberated by sources other than xanthine oxidase. *Biol.Chem.Hoppe Seyler* 1991;372:35-41

Farhood A., McGuire GM, Manning AM, Miyasaka M, Smith CW, Jaeschke H. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J.Leukoc.Biol.* 1995;57:368-374

Fernandez L., Heredia N, Grande L, Gomez G, Rimola A, Marco A et al. Preconditioning protects liver and lung damage in rat liver transplantation: role of xanthine/xanthine oxidase. *Hepatology* 2002;36:562-572

Francis S. H., Corbin JD. Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu.Rev.Physiol.* 1994;56:237-272

Francis S. H., Corbin JD. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. *Crit.Rev.Clin.Lab Sci.* 1999;36:275-328

Fratte S., Gendrault JL, Steffan AM, Kirn A. Comparative ultrastructural study of rat livers preserved in Euro-Collins or University of Wisconsin solution. *Hepatology* 1991;13:1173-1180

Fürst R., Vollmar AM, Kiemer AK. Induction of MKP-1 by the Atrial Natriuretic Peptide is mediated *via* reactive oxygen species and JNK in Human Endothelial Cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. of Pharmacol.* 2003;367 (Supplement 1), abstract

Gao W. S., Hijioaka T, Lindert KA, Caldwell-Kenkel JC, Lemasters JJ, Thurman RG. Evidence that adenosine is a key component in Carolina rinse responsible for reducing graft failure after orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1991;52:992-998

Gerbes A. L., Vollmar AM, Kiemer AK, Bilzer M. The guanylate cyclase-coupled natriuretic peptide receptor: a new target for prevention of cold ischemia-reperfusion damage of the rat liver. *Hepatology* 1998;28:1309-1317

Gerwig T., Kiemer AK, Vollmar AM, Gerbes AL. ANP-Präkonditionierung induziert die Hämoxxygenase-1 in der isoliert perfundierten Rattenleber. *Z. Gastroenterol* 2001;6:487, abstract

Gerwig T. Prevention of Ischemia-Reperfusion Injury in the Rat Liver by Atrial Natriuretic Peptide: Insights into Mechanisms and Mode of Cell Death. 2002, Dissertation

Gerwig T., Meißner H, Bilzer M, Arnholdt H, Kiemer AK, Vollmar AM, Gerbes AL. ANP preconditioning protects against hepatic preservation injury by attenuating apoptotic and necrotic cell death, in Revision

Ginzinger D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp.Hematol.* 2002;30:503-512

Giulietti A., Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 2001;25:386-401

Glazier S. S., O'Rourke DM, Graham DI, Welsh FA. Induction of ischemic tolerance following brief focal ischemia in rat brain. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 1994;14:545-553

Goralska M., Dackor R, Holley B, McGahan MC. Alpha lipoic acid changes iron uptake and storage in lens epithelial cells. *Exp.Eye Res.* 2003;76:241-248

Gross G. J., Fryer RM. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and myocardial preconditioning. *Circ.Res.* 1999;84:973-979

Halliwell B., Gutteridge JM. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. *Free Radic.Biol.Med.* 1989;86-179

Han D., Handelman G, Marcocci L, Sen CK, Roy S, Kobuchi H et al. Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization. *Biofactors* 1997;6:321-338

Hansen T. N., Dawson PE, Brockbank KG. Effects of hypothermia upon endothelial cells: mechanisms and clinical importance. *Cryobiology* 1994;31:101-106

Hanson E. S., Leibold EA. Regulation of iron regulatory protein 1 during hypoxia and hypoxia/reoxygenation. *J Biol.Chem.* 1998;273:7588-7593

Hentze M. W., Rouault TA, Harford JB, Klausner RD. Oxidation-reduction and the molecular mechanism of a regulatory RNA-protein interaction. *Science* 1989;244:357-359

Hentze M. W., Kuhn LC. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996;93:8175-8182

Holloway C. M., Harvey PR, Mullen JB, Strasberg SM. Evidence that cold preservation-induced microcirculatory injury in liver allografts is not mediated by oxygen-free radicals or cell swelling in the rat. *Transplantation* 1989;48:179-188

Hotter G., Closa D, Prados M, Fernandez-Cruz L, Prats N, Gelpi E et al. Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1996;222:27-32

Hu R. M., Levin ER, Pedram A, Frank HJ. Atrial natriuretic peptide inhibits the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. Mediation through the C receptor. *J.Biol.Chem.* 1992;267:17384-17389

Immenschuh S., Kietzmann T, Hinke V, Wiederhold M, Katz N, Muller-Eberhard U. The rat heme oxygenase-1 gene is transcriptionally induced via the protein kinase A signaling pathway in rat hepatocyte cultures. *Mol.Pharmacol.* 1998;53:483-491

Ishitani R., Chuang DM. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antisense oligodeoxynucleotides protect against cytosine arabinonucleoside-induced apoptosis in cultured cerebellar neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996;93:9937-9941

Ishitani R., Kimura M, Sunaga K, Katsube N, Tanaka M, Chuang DM. An antisense oligodeoxynucleotide to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase blocks age-induced apoptosis of mature cerebrocortical neurons in culture. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1996a;278:447-454

Ishitani R., Sunaga K, Hirano A, Saunders P, Katsube N, Chuang DM. Evidence that glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in age-induced apoptosis in mature cerebellar neurons in culture. *J.Neurochem.* 1996b;66:928-935

Ito K., Ozasa H, Sanada K, Horikawa S. Doxorubicin preconditioning: a protection against rat hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 2000;31:416-419

Ito Y., Pagano PJ, Tornheim K, Brecher P, Cohen RA. Oxidative stress increases glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA levels in isolated rabbit aorta. *Am.J. Physiol.* 1996;270:H81-H87

Jaeschke H., Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Superoxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Free Radic.Res.Commun.* 1991;15:277-284

Jaeschke H., Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am.J.Physiol.* 1991;260:G355-G362

Jaeschke H., Smith CW. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J.Leukoc.Biol.* 1997;61:647-653

Jarchau T., Hausler C, Markert T, Pohler D, Vanderkerckhove J, De Jonge HR et al. Cloning, expression, and in situ localization of rat intestinal cGMP-dependent protein kinase II. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994;91:9426-9430

Kakhlon O., Gruenbaum Y, Cabantchik ZI. Repression of the heavy ferritin chain increases the labile iron pool of human K562 cells. *Biochem.J.* 2001;356:311-316

Kawano K., Kim YI, Kaketani K, Kobayashi M. The beneficial effect of cyclosporine on liver ischemia in rats. *Transplantation* 1989;48:759-764

Keeffe E. B. Liver transplantation: current status and novel approaches to liver replacement. *Gastroenterology* 2001;120:749-762

Kenngott S., Beuers U, Wimmer R, Gerbes AL, Bilzer M. ANP and 8-Br-cGMP lowered membrane bound α - and ϵ -PKC in the isolated rat liver after 30' perfusion. *J.Hepatol.* 2001;34:962, abstract

Kerkweg U., Li T, de Groot H, Rauen U. Cold-induced apoptosis of rat liver cells in University of Wisconsin solution: the central role of chelatable iron. *Hepatology* 2002;35:560-567

Kiemer A. K., Vollmar AM. Effects of different natriuretic peptides on nitric oxide synthesis in macrophages. *Endocrinology* 1997;138:4282-4290

Kiemer A. K., Vollmar AM. Autocrine regulation of inducible nitric-oxide synthase in macrophages by atrial natriuretic peptide. *J.Biol.Chem.* 1998;273:13444-13451

Kiemer A. K., Vollmar AM, Bilzer M, Gerwig T, Gerbes AL. Atrial natriuretic peptide reduces expression of TNF-alpha mRNA during reperfusion of the rat liver upon decreased activation of NF-kappaB and AP-1. *J.Hepatol.* 2000;33:236-246

Kiemer A. K., Vollmar AM. Elevation of intracellular calcium levels contributes to the inhibition of nitric oxide production by atrial natriuretic peptide. *Immunol.Cell.Biol.* 2001a;79:11-17

Kiemer A. K., Vollmar AM. Induction of L-arginine transport is inhibited by atrial natriuretic peptide: a peptide hormone as a novel regulator of inducible nitric-oxide synthase substrate availability. *Mol.Pharmacol.* 2001b;60:421-426

Kiemer A. K., Weber NC, Fürst R, Bildner N, Kulhanek-Heinze S, Vollmar AM. Inhibition of p38 MAPK activation via induction of MKP-1: atrial natriuretic peptide reduces TNF-alpha-induced actin polymerization and endothelial permeability. *Circ.Res.* 2002a;90:874-881

Kiemer A. K., Lehner MD, Hartung T, Vollmar AM. Inhibition of cyclooxygenase-2 by natriuretic peptides. *Endocrinology* 2002b;143:846-852

Kiemer A. K., Gerbes AL, Bilzer M, Vollmar AM. The atrial natriuretic peptide and cGMP: novel activators of the heat shock response in rat livers. *Hepatology* 2002c;35:88-94

Kiemer A. K., Baron A, Gerbes AL, Bilzer M, Vollmar AM. The atrial natriuretic peptide as a regulator of Kupffer cell functions. *Shock* 2002d;17:365-371

Kiemer A. K., Gerwig T, Gerbes AL, Meißner H, Bilzer M, Vollmar AM. Kupffer-cell specific induction of heme oxygenase-1 (HSP32) by the atrial natriuretic peptide - role of cGMP. *J.Hepatol.* 2003;38:490-498

Kleiner D. E., Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal.Biochem.* 1994;218:325-329

Koeppel T. A., Lehmann TG, Thies JC, Gehrcke R, Gebhard MM, Herfarth C et al. Impact of N-acetylcysteine on the hepatic microcirculation after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1996;61:1397-1402

Konijn A. M., Glickstein H, Vaisman B, Meyron-Holtz EG, Slotki IN, Cabantchik ZI. The cellular labile iron pool and intracellular ferritin in K562 cells. *Blood* 1999;94:2128-2134

Konrad D., Somwar R, Sweeney G, Yaworsky K, Hayashi M, Ramlal T et al. The antihyperglycemic drug alpha-lipoic acid stimulates glucose uptake via both GLUT4 translocation and GLUT4 activation: potential role of p38 mitogen-activated protein kinase in GLUT4 activation. *Diabetes* 2001;50:1464-1471

Korthius R. J., Gute DC, Cepinskas G, Kvietys PR. Cellular mechanisms of acute versus delayed preconditioning. *Pathophysiology* 1998;5:35-48

Kosmopoulou I., Koliakos G, Haitoglou C, Christodoulou D, Dimitriadou A, Trakatellis A. Rat liver endoplasmic reticulum protein kinases. *Int.J.Biochem.* 1994;26:403-414

Kragten E., Lalande I, Zimmermann K, Roggo S, Schindler P, Muller D et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, the putative target of the antiapoptotic compounds CGP 3466 and R-(-)-deprenyl. *J.Biol.Chem.* 1998;273:5821-5828

Kusumoto K., Morimoto T, Minor T, Uchino J, Isselhard W. Allopurinol effects in rat liver transplantation on recovery of energy metabolism and free radical-induced damage. *Eur.Surg.Res.* 1995;27:285-291

Kyhse-Andersen J. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J.Biochem.Biophys.Methods* 1984;10:203-209

Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685

Lalu M. M., Csonka C, Giricz Z, Csont T, Schulz R, Ferdinandy P. Preconditioning decreases ischemia/reperfusion-induced release and activation of matrix metalloproteinase-2. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2002;296:937-941

Langenickel T., Pagel I, Hohnel K, Dietz R, Willenbrock R. Differential regulation of cardiac ANP and BNP mRNA in different stages of experimental heart failure. *Am.J.Physiol. Heart Circ.Physiol.* 2000;278:H1500-H1506

Lawson D. M., Treffry A, Artymiuk PJ, Harrison PM, Yewdall SJ, Luzzago A et al. Identification of the ferroxidase centre in ferritin. *FEBS Lett.* 1989;254:207-210

Le Moine O., Louis H, Stordeur P, Collet JM, Goldman M, Deviere J. Role of reactive oxygen intermediates in interleukin 10 release after cold liver ischemia and reperfusion in mice. *Gastroenterology* 1997;113:1701-1706

Lemasters J. J., Bunzendahl H, Thurman RG. Reperfusion injury to donor livers stored for transplantation. *Liver Transpl.Surg.* 1995;1:124-138

Leslie N. R., Biondi RM, Alessi DR. Phosphoinositide-regulated kinases and phosphoinositide phosphatases. *Chem.Rev.* 2001;101:2365-2380

Levin E. R., Frank HJ. Natriuretic peptides inhibit rat astroglial proliferation: mediation by C receptor. *Am.J.Physiol.* 1991;261:R453-R457

Levin E. R., Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N.Engl.J.Med.* 1998;339:321-328

Li R. C., Ping P, Zhang J, Wead WB, Cao X, Gao J et al. PKCepsilon modulates NF-kappaB and AP-1 via mitogen-activated protein kinases in adult rabbit cardiomyocytes. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* 2000;279:H1679-H1689

Liedtke A. J., Lynch ML. Alteration of gene expression for glycolytic enzymes in aerobic and ischemic myocardium. *Am.J Physiol.* 1999;277:H1435-H1440

Lincoln T. M., Cornwell TL. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J.* 1993;7:328-338

Lisy O., Jougasaki M, Heublein DM, Schirger JA, Chen HH, Wennberg PW et al. Renal actions of synthetic dendroaspis natriuretic peptide. *Kidney Int.* 1999;56:502-508

Lloris-Carsi J. M., Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH, Calvo MA, Suzuki S. Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. *Transplant.Proc.* 1993;25:3303-3304

Lohmann S. M., Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem.Sci.* 1997;22:307-312

Lowry O. H., Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J.Biol.Chem* 1951;193:265-271

Maines M. D. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 1997;37:517-554

Mandel M., Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J.Mol.Biol* 1970;53:159-162

Marsh D. C., Lindell SL, Fox LE, Belzer FO, Southard JH. Hypothermic preservation of hepatocytes. I. Role of cell swelling. *Cryobiology* 1989;26:524-534

Marubayashi S., Dohi K, Ochi K, Kawasaki T. Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: prevention of damage by alpha-tocopherol administration. *Surgery* 1986;99:184-192

Massova I., Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J* 1998;12:1075-1095

Mathews W. R., Guido DM, Fisher MA, Jaeschke H. Lipid peroxidation as molecular mechanism of liver cell injury during reperfusion after ischemia. *Free Radic.Biol.Med.* 1994;16:763-770

Maulik N., Sato M, Price BD, Das DK. An essential role of NFkappaB in tyrosine kinase signaling of p38 MAP kinase regulation of myocardial adaptation to ischemia. *FEBS Lett.* 1998;429:365-369

McCoubrey W. K., Jr., Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur.J.Biochem.* 1997;247:725-732

McKeown C. M., Edwards V, Phillips MJ, Harvey PR, Petrunka CN, Strasberg SM. Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation* 1988;46:178-191

McLaughlin, E. A., Hall L. Nucleotide sequence of rat testis-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH-2) cDNA, nicht veröffentlicht.

Misono K. S., Fukumi H, Grammer RT, Inagami T. Rat atrial natriuretic factor: complete amino acid sequence and disulfide linkage essential for biological activity. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1984;119:524-529

Mönkkönen J., Heath TD. The effects of liposome-encapsulated and free clodronate on the growth of macrophage-like cells in vitro: the role of calcium and iron. *Calcif.Tissue Int.* 1993;53:139-146

Mtairag el M., Houard X, Rais S, Pasquier C, Oudghiri M, Jacob MP et al. Pharmacological potentiation of natriuretic peptide limits polymorphonuclear neutrophil-vascular cell interactions. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2002;22:1824-1831

Mullis K. B., Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-350

Murry C. E., Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-1136

Müller, C. α -Lipoic Acid Attenuates Ischemia Reperfusion Injury of the Rat Liver: Mechanisms of Protection. 2002, Dissertation

Müller, C., Vollmar AM, Kiemer AK. α -Lipoic Acid Preconditioning reduces Ischemia/Reperfusion Injury of the Rat Liver *via* the PI3-Kinase/Akt Pathway, in Revision

Müller L., Menzel H. Studies on the efficacy of lipoate and dihydrolipoate in the alteration of cadmium²⁺ toxicity in isolated hepatocytes. *Biochim.Biophys.Acta* 1990;1052:386-391

- Nagase H.** Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol.Chem.* 1997;378:151-160
- Nakamoto M., Shapiro JI, Shanley PF, Chan L, Schrier RW.** In vitro and in vivo protective effect of atriopeptin III on ischemic acute renal failure. *J.Clin.Invest* 1987;80:698-705
- Narahari J., Ma R, Wang M, Walden WE.** The aconitase function of iron regulatory protein 1. Genetic studies in yeast implicate its role in iron-mediated redox regulation. *J.Biol.Chem.* 2000;275:16227-16234
- Nemer M., Chamberland M, Sirois D, Argentin S, Drouin J, Dixon RA et al.** Gene structure of human cardiac hormone precursor, pronatriodilatin. *Nature* 1984;312:654-656
- Neubauer K., Armbrust T, Kuethe F, Saile B, and Ramadori G.** Gadoliniumchloride Treatment of Rat Livers induces a functional Alteration but not a Depletion of Kupffer Cells. *Hepatology* 2002;36(4 Pt. 2):664, abstract
- Omar R., Nomikos I, Piccorelli G, Savino J, Agarwal N.** Prevention of postischaemic lipid peroxidation and liver cell injury by iron chelation. *Gut* 1989;30:510-514
- Packer L., Witt EH, Tritschler HJ.** alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic.Biol.Med.* 1995;19:227-250
- Packer L.** alpha-Lipoic acid: a metabolic antioxidant which regulates NF-kappa B signal transduction and protects against oxidative injury. *Drug Metab.Rev.* 1998;30:245-275
- Palaparti A., Li Y, Anand-Srivastava MB.** Inhibition of atrial natriuretic peptide (ANP) C receptor expression by antisense oligodeoxynucleotides in A10 vascular smooth-muscle cells is associated with attenuation of ANP-C-receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase. *Biochem.J.* 2000;346 Pt 2:313-320

Pantopoulos K., Hentze MW. Nitric oxide signaling to iron-regulatory protein: direct control of ferritin mRNA translation and transferrin receptor mRNA stability in transfected fibroblasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995;92:1267-1271

Paraskeva E., Hentze MW. Iron-sulphur clusters as genetic regulatory switches: the bifunctional iron regulatory protein-1. *FEBS Lett.* 1996;389:40-43

Peralta C., Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosello-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 1997;25:934-937

Peralta C., Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E et al. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology* 1999;29:126-132

Pfeifer A., Ruth P, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P, Hofmann F. Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.* 1999;135:105-149

Picard V., Renaudie F, Porcher C, Hentze MW, Grandchamp B, Beaumont C. Overexpression of the ferritin H subunit in cultured erythroid cells changes the intracellular iron distribution. *Blood* 1996;87:2057-2064

Picard V., Epsztejn S, Santambrogio P, Cabantchik ZI, Beaumont C. Role of ferritin in the control of the labile iron pool in murine erythroleukemia cells. *J.Biol.Chem.* 1998;273:15382-15386

Ping P., Murphy E. Role of p38 mitogen-activated protein kinases in preconditioning: a detrimental factor or a protective kinase? *Circ.Res.* 2000;86:921-922

Pippard M. J., Jackson MJ, Hoffman K, Petrou M, Modell CB. Iron chelation using subcutaneous infusions of diethylene triamine penta-acetic acid (DTPA). *Scand.J.Haematol.* 1986;36:466-472

Ponka P. Cellular iron metabolism. *Kidney Int.Suppl.* 1999;69:S2-11

Rauen U., Petrat F, Li T, de Groot H. Hypothermia injury/cold-induced apoptosis--evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O₂-/H₂O₂ formation. *FASEB J.* 2000;14:1953-1964

Reed L.J., DeBusk B.G., Gunsalas I.C., Hornberger C.S. Crystalline Lipoic Acid: A Catalytic Agent Associated With Pyruvate Dehydrogenase. *Science* 1951;114:93-94

Ricciardi R., Meyers WC, Schaffer BK, Kim RD, Shah SA, Wheeler SM et al. Protein kinase C inhibition abrogates hepatic ischemic preconditioning responses. *J.Surg.Res.* 2001;97:144-149

Rogers J. T., Andriotakis JL, Lacroix L, Durmowicz GP, Kasschau KD, Bridges KR. Translational enhancement of H-ferritin mRNA by interleukin-1 beta acts through 5' leader sequences distinct from the iron responsive element. *Nucleic Acids Res.* 1994;22:2678-2686

Rosenzweig A., Seidman CE. Atrial natriuretic factor and related peptide hormones. *Annu.Rev.Biochem.* 1991;60:229-255

Rosser B. G., Gores GJ. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 1995;108:252-275

Rowland R. T., Meng X, Cleveland JC, Meldrum DR, Harken AH, Brown JM. Cardioadaptation induced by cyclic ischemic preconditioning is mediated by translational regulation of de novo protein synthesis. *J.Surg.Res.* 1997;71:155-160

Ryter S. W., Tyrrell RM. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic.Biol.Med.* 2000;28:289-309

Saido T. C., Sorimachi H, Suzuki K. Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB J.* 1994;8:814-822

- Sandberg M., Natarajan V, Ronander I, Kalderon D, Walter U, Lohmann SM et al.** Molecular cloning and predicted full-length amino acid sequence of the type I beta isozyme of cGMP-dependent protein kinase from human placenta. Tissue distribution and developmental changes in rat. *FEBS Lett.* 1989;255:321-329
- Saunders P. A., Chen RW, Chuang DM.** Nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoforms during neuronal apoptosis. *J.Neurochem.* 1999;72:925-932
- Sawa A., Khan AA, Hester LD, Snyder SH.** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997;94:11669-11674
- Scarim A. L., Heitmeier MR, Corbett JA.** Heat shock inhibits cytokine-induced nitric oxide synthase expression by rat and human islets. *Endocrinology* 1998;139:5050-5057
- Schalinske K. L., Eisenstein RS.** Phosphorylation and activation of both iron regulatory proteins 1 and 2 in HL-60 cells. *J.Biol.Chem.* 1996;271:7168-7176
- Schauer R. J., Gerbes AL, Vonier D, op dW, Fraunberger P, Bilzer M.** Induction of cellular resistance against Kupffer cell-derived oxidant stress: a novel concept of hepatoprotection by ischemic preconditioning. *Hepatology* 2003;37:286-295
- Schiaffonati L., Cairo G, Bernelli-Zazzera A.** RNA synthesis by nuclei and nucleoli from ischemic liver cells. *J.Cell.Physiol.* 1978;97:487-496
- Schirger J. A., Heublein DM, Chen HH, Lisy O, Jougasaki M, Wennberg PW et al.** Presence of Dendroaspis natriuretic peptide-like immunoreactivity in human plasma and its increase during human heart failure. *Mayo Clin.Proc.* 1999;74:126-130
- Schulz-Knappe P., Forssmann K, Herbst F, Hock D, Pipkorn R, Forssmann WG.** Isolation and structural analysis of "urodilatin", a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)-family, extracted from human urine. *Klin.Wochenschr.* 1988;66:752-759

- Schulz R., Cohen MV, Behrends M, Downey JM, Heusch G.** Signal transduction of ischemic preconditioning. *Cardiovasc.Res.* 2001;52:181-198
- Seglen P. O.** Preparation of rat liver cells. 3. Enzymatic requirements for tissue dispersion. *Exp.Cell.Res.* 1973;82:391-398
- Serracino-Inglott F., Habib NA, Mathie RT.** Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am.J.Surg.* 2001;181:160-166
- Shaw S. G., Weidmann P, Hodler J, Zimmermann A, Paternostro A.** Atrial natriuretic peptide protects against acute ischemic renal failure in the rat. *J.Clin.Invest.* 1987;80:1232-1237
- Shito M., Wakabayashi G, Ueda M, Shimazu M, Shirasugi N, Endo M et al.** Interleukin 1 receptor blockade reduces tumor necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation* 1997;63:143-148
- Silberbach M., Roberts CT, Jr.** Natriuretic peptide signalling: molecular and cellular pathways to growth regulation. *Cell Signal.* 2001;13:221-231
- Sirover M. A.** New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim.Biophys.Acta* 1999;1432:159-184
- Southard J. H., Belzer FO.** Organ preservation. *Annu.Rev.Med.* 1995;46:235-247
- Speechly-Dick M. E., Mocanu MM, Yellon DM.** Protein kinase C. Its role in ischemic preconditioning in the rat. *Circ.Res.* 1994;75:586-590
- Starzl T. E.** Liver transplantation. *Johns.Hopkins.Med.J.* 1978;143:73-83
- Stocker R., Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN.** Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987;235:1043-1046
- Sudoh T., Kangawa K, Minamino N, Matsuo H.** A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988;332:78-81

Sudoh T., Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1990;168:863-870

Suematsu M., Ishimura Y. The heme oxygenase-carbon monoxide system: a regulator of hepatobiliary function. *Hepatology* 2000;31:3-6

Suzuki Y. J., Tsuchiya M, Packer L. Thiocctic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species. *Free Radic.Res.Commun.* 1991;15:255-263

Tacchini L., Recalcati S, Bernelli-Zazzera A, Cairo G. Induction of ferritin synthesis in ischemic-reperfused rat liver: analysis of the molecular mechanisms. *Gastroenterology* 1997;113:946-953

Takei Y., Marzi I, Kauffman FC, Currin RT, Lemasters JJ, Thurman RG. Increase in survival time of liver transplants by protease inhibitors and a calcium channel blocker, nisoldipine. *Transplantation* 1990;50:14-20

Tamura N., Itoh H, Ogawa Y, Nakagawa O, Harada M, Chun TH et al. cDNA cloning and gene expression of human type Ialpha cGMP-dependent protein kinase. *Hypertension* 1996;27:552-557

Tenhunen R., Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1968;61:748-755

Teoh N., Dela PA, Farrell G. Hepatic ischemic preconditioning in mice is associated with activation of NF-kappaB, p38 kinase, and cell cycle entry. *Hepatology* 2002;36:94-102

Terajima H., Enders G, Thiaener A, Hammer C, Kondo T, Thiery J et al. Impact of hyperthermic preconditioning on posts ischemic hepatic microcirculatory disturbances in an isolated perfusion model of the rat liver. *Hepatology* 2000;31:407-415

Thomson A. M., Rogers JT, Leedman PJ. Iron-regulatory proteins, iron-responsive elements and ferritin mRNA translation. *Int.J.Biochem.Cell.Biol.* 1999;31:1139-1152

Thomson A. M., Rogers JT, Leedman PJ. Thyrotropin-releasing hormone and epidermal growth factor regulate iron-regulatory protein binding in pituitary cells via protein kinase C-dependent and -independent signaling pathways. *J.Biol.Chem.* 2000;275:31609-31615

Torczyński R., Bollon AP, Fuke M. The complete nucleotide sequence of the rat 18S ribosomal RNA gene and comparison with the respective yeast and frog genes. *Nucleic Acids Res.* 1983;11:4879-4890

Torti S. V., Kwak EL, Miller SC, Miller LL, Ringold GM, Myambo KB et al. The molecular cloning and characterization of murine ferritin heavy chain, a tumor necrosis factor-inducible gene. *J.Biol.Chem.* 1988;263:12638-12644

Toth I., Yuan L, Rogers JT, Boyce H, Bridges KR. Hypoxia alters iron-regulatory protein-1 binding capacity and modulates cellular iron homeostasis in human hepatoma and erythroleukemia cells. *J Biol.Chem.* 1999;274:4467-4473

Tso J. Y., Sun XH, Kao TH, Reece KS, Wu R. Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res.* 1985;13:2485-2502

Tsuruda T., Boerrigter G, Huntley BK, Noser JA, Cataliotti A, Costello-Boerrigter LC et al. Brain natriuretic Peptide is produced in cardiac fibroblasts and induces matrix metalloproteinases. *Circ.Res.* 2002;91:1127-1134

Upadhy A. G., Harvey RP, Howard TK, Lowell JA, Shenoy S, Strasberg SM. Evidence of a role for matrix metalloproteinases in cold preservation injury of the liver in humans and in the rat [see comments]. *Hepatology* 1997;26:922-928

Upadhy G. A., Strasberg SM. Glutathione, lactobionate, and histidine: cryptic inhibitors of matrix metalloproteinases contained in University of Wisconsin and histidine/tryptophan/ketoglutarate liver preservation solutions. *Hepatology* 2000;31:1115-1122

van Rooijen N. Extracellular and intracellular action of clodronate in osteolytic bone diseases? A hypothesis. *Calcif.Tissue Int.* 1993;52:407-410

van Rooijen N., Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J.Immunol.Methods* 1994;174:83-93

Venugopal J. Cardiac natriuretic peptides--hope or hype? *J.Clin.Pharm.Ther.* 2001;26:15-31

Vile G. F., Tyrrell RM. Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *J.Biol.Chem.* 1993;268:14678-14681

Vile G. F., Basu-Modak S, Waltner C, Tyrrell RM. Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994;91:2607-2610

Vollmar A. M., Paumgartner G, Gerbes AL. Differential gene expression of the three natriuretic peptides and natriuretic peptide receptor subtypes in human liver. *Gut* 1997a;40:145-150

Vollmar A. M., Forster R, Schulz R. Effects of atrial natriuretic peptide on phagocytosis and respiratory burst in murine macrophages. *Eur.J.Pharmacol.* 1997b;319:279-285

Wei Y., Miller SC, Tsuji Y, Torti SV, Torti FM. Interleukin 1 induces ferritin heavy chain in human muscle cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1990;169:289-296

Westermarck J., Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999;13:781-792

White K., Munro HN. Induction of ferritin subunit synthesis by iron is regulated at both the transcriptional and translational levels. *J.Biol.Chem.* 1988;263:8938-8942

Wiedermann C. J., Niedermuhlbichler M, Braunsteiner H, Widermann CJ. Priming of polymorphonuclear neutrophils by atrial natriuretic peptide in vitro. *J.Clin.Invest.* 1992;89:1580-1586

Winwood P. J., Schuppan D, Iredale JP, Kawser CA, Docherty AJ, Arthur MJ. Kupffer cell-derived 95-kd type IV collagenase/gelatinase B: characterization and expression in cultured cells. *Hepatology* 1995;22:304-315

Woessner J. F., Jr. The family of matrix metalloproteinases. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1994;732:11-21

Worwood M., Brook JD, Cragg SJ, Hellkuhl B, Jones BM, Perera P et al. Assignment of human ferritin genes to chromosomes 11 and 19q13.3----19qter. *Hum.Genet.* 1985;69:371-374

Xuan Y. T., Tang XL, Banerjee S, Takano H, Li RC, Han H et al. Nuclear factor-kappaB plays an essential role in the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Circ.Res.* 1999;84:1095-1109

Yang H., Majno P, Morel P, Toso C, Triponez F, Oberholzer J et al. Prostaglandin E(1) protects human liver sinusoidal endothelial cell from apoptosis induced by hypoxia reoxygenation. *Microvasc.Res.* 2002;64:94-103

Yeh K. Y., Yeh M, Glass J. Expression of intestinal brush-border membrane hydrolases and ferritin after segmental ischemia-reperfusion in rats. *Am.J.Physiol* 1998;275:G572-G583

Yin D. P., Sankary HN, Chong AS, Ma LL, Shen J, Foster P et al. Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation-reperfusion injury in rats. *Transplantation* 1998;66:152-157

Yokomori N., Iwasa Y, Aida K, Inoue M, Tawata M, Onaya T. Transcriptional regulation of ferritin messenger ribonucleic acid levels by insulin in cultured rat glioma cells. *Endocrinology* 1991;128:1474-1480

Zahringer J., Baliga BS, Munro HN. Novel mechanism for translational control in regulation of ferritin synthesis by iron. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1976;73:857-861

Zhou W., McCollum MO, Levine BA, Olson MS. Inflammation and platelet-activating factor production during hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology* 1992;16:1236-1240

8 DANKSAGUNG

Bei Frau Prof. Dr. Angelika M. Vollmar möchte ich mich ganz herzlich für die großzügige Unterstützung und sehr gute Betreuung dieser Arbeit bedanken. Die zahlreichen fachlichen und auch persönlichen Gespräche und Diskussionen waren mir eine große Hilfe und haben den Fortgang dieser Arbeit entscheidend beeinflusst.

Für die Übernahme des Koreferats danke ich Herrn Prof. Dr. Ernst Wagner.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Frau Dr. Alexandra K. Kiemer, die meine Arbeit während meiner ganzen Tätigkeit sehr unterstützt hat und immer ein offenes Ohr für Anliegen aller Art hatte. Ihre zahlreichen Anregungen und Tipps haben mir bei der Fertigstellung dieser Arbeit sehr geholfen.

Für die Ermöglichung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit im Department Pharmazie und für die anregenden Diskussion im Rahmen der DFG-Forschergruppe möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Alexander L. Gerbes bedanken. In diesem Zusammenhang möchte ich auch allen anderen Mitgliedern der Forschergruppe, insbesondere Herrn PD Dr. Manfred Bilzer, für sehr interessante und auch hilfreiche Gespräche und Diskussionen danken.

Vielen Dank auch an die DFG für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Bei Herrn Dr. Andres Höflich möchte ich mich für die Durchführung der Real-Time PCR und für zahlreiche Diskussionen, Anregungen und Hilfestellungen, die mir beim Etablieren dieser Methode an unserem Lehrstuhl eine sehr große Hilfe waren, bedanken.

Ein ganz großes Danke schön auch an Herrn Dr. Andrew M. Thomson für seine Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit bei all meinen Anliegen und Fragen und für die mehrmalige Zusendung eines IRP-1 Antikörpers.

Herrn Dr. Sebastian Müller danke ich für die Bereitstellung des I-12.CAT Plasmids für den RNA-Electrophoretic Mobility Shift Assay, Herrn Prof. Dr. Matthias Hentze für die Versorgung mit dem IRP-1 Antikörper, Herrn Dr. Herbert Meißner für die immunhistologischen Untersuchungen und Herrn Prof. Dr. Hermann Ammer für die Bereitstellung des Kaninchenserums.

Bei Tobias Gerwig, Christian Müller, Thomas Prüfer und Stefanie Kulhanek-Heinze möchte ich mich ganz besonders für die durchgeführten Leberperfusionen und die Hepatozytenisolierung bedanken. Christian Müller und auch seiner Nachfolgerin Signe Blumenthal danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung des Praktikums Pharmazeutische Biologie III.

Allen Kollegen möchte ich für die kollegiale Zusammenarbeit und die freundschaftliche Unterstützung danken, die zum Gelingen dieser Arbeit mit beigetragen haben.

Ganz besonderen Dank an Nina Weber für ihre gute Freundschaft, für die sehr schöne gemeinsame Zeit in München und dafür, dass sie auch in sehr schwierigen Situationen immer für mich da war, an Robert Fürst, Signe Blumenthal, Nicole Mohaupt und Elke Koch ebenfalls für ihre Freundschaft, für viele schöne Stunden und viel Spaß auch außerhalb des Labors, an Brigitte Weiss, Rita Socher, Raima Yasar und auch Ursula Kollmannsberger für die tatkräftige Unterstützung im Labor und auch während des Praktikums, an alle PB III-ler, die an der Organisation, Gestaltung und Durchführung des Praktikums mitgewirkt haben und an Veronika Rickl für die Hilfe bei meinen Postern.

Ein ganz herzliches Danke schön auch an Elke Koch und Peter Bristot für die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Meinen Eltern danke ich für ihre stete Hilfe und tatkräftige Unterstützung, nicht nur während meiner Doktorarbeit.

9 LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Anke Christina Förnges
Geburtsdatum: 03.07.1973
Geburtsort: Düren/NRW
Staatsangehörigkeit: Deutsch

AUSBILDUNGS DATEN

1979 - 1983 Grundschole Gauting
1983 - 1992 Neusprachliches Gymnasium Gauting
11/1992 - 04/1998 Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-
Universität München (11/1993 - 10/1994 Unterbrechung
aufgrund eines unverschuldeten Verkehrsunfalls)
03/1996 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
04/1998 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
07/1999 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

PRAKTISCHE TÄTIGKEITEN

09/1993 - 10/1993 Famulatur in der Godo-Apotheke, Gauting
11/1994 - 01/1998 Hilfskraft in der Godo-Apotheke, Gauting
05/1998 - 10/1998 Praktische Ausbildung in der Apotheke im Kaufland,
Augsburg
11/1998 - 04/1999 Praktische Ausbildung bei BAYER Leverkusen

BERUFSTÄTIGKEIT

08/1999 – 01/2000 Einhorn-Apotheke, Hamburg-Altona

WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT

seit Februar 2000: Beginn der vorliegenden Dissertationsarbeit unter Leitung von
Prof. Dr. A. M. Vollmar, Department Pharmazie, Zentrum für
Pharmaforschung, Ludwig-Maximilians-Universität München