

# Calciumkanaldichte in humanem ischämischen und reperfundierten, rechtsatrialen Myokardgewebe

Von der Medizinischen Fakultät  
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen  
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Birte Maura Greiser

aus  
Münster

Berichter: Herr Universitätsprofessor  
Dr. med. P. Hanrath  
  
Herr Professor  
Dr. med Dipl.-Phys. F. Schöndube

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Mai 2001

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar

meinen Eltern gewidmet

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AKE	Aortenklappenersatz
AS	Aortenklappenstenose
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cpm	counts per minute
dpm	desintegrations per minute
EF	Ejektionsfraktion
F	Freie Aktivität des Liganden
IC <sub>50</sub>	Konzentration des Verdrängers bei der halbmaximalen Bindung des Liganden an den Rezeptor
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante für die Bindung eines Radioligandenliganden an den Rezeptor
KHK	Koronare Herzerkrankung
K <sub>i</sub>	Dissoziationskonstante der Bindung eines Verdrängers an den Rezeptor
L	Konzentration des freien Liganden
LR	Konzentration des Ligand-Rezeptor-Komplexes
MKE	Mitralklappenersatz
MS	Mitralklappenstenose
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	Natrium-Kalium Adenosintriphosphatase
R	Konzentration des nicht besetzten Rezeptors
Rya-CRK	Ryanodin-sensitiver Calcium Freisetzungskanal des Sarkoplasmatischen Retikulums
SB	Spezifische Bindung
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SERCA	Calcium Adenosintriphosphatase des Sarkoplasmatischen Retikulums
SR-Ca <sup>2+</sup> -ATPase	s. SERCA
TB	Totale Bindung
UB	Unspezifische Bindung

# Inhaltsverzeichnis

<b>Kapitel</b>	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1 Calciumcycling im Kardiomyozyten	7
1.2 Einfluß von Ischämie und Reperfusion auf das intracelluläre Calciumcycling	9
1.3 Ziel der Studie	10
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>11</b>
2.1 Aufbau der Studie	11
2.2 Patienten und Probenentnahme	11
2.3 Dichtebestimmung des Ryanodin-sensitiven Calciumfreisetzungskanals des SR (Rya - CRK)	12
2.3.1 Prinzip der Radioligandenbindung	12
2.3.2 Gewebeaufbearbeitung	17
2.3.3 Proteinbestimmung	18
2.3.4 Durchführung des Bindungsexperimentes	19
2.3.5 Wahl der Inkubationszeit	21
2.3.6 Proteinabhängigkeit der Rezeptordichte	22
2.3.7 Calciumabhängigkeit der Ryanodinbindung	23
2.4 Dichtebestimmung des L-Typ Calciumkanals	25
2.4.1 Prinzip der Radioligandenbindung	25
2.4.2 Gewebeaufbearbeitung	25
2.4.3 Durchführung des Bindungsexperimentes	27
2.4.4 Wahl der Inkubationszeit	30
2.4.5 Proteinabhängigkeit der Rezeptordichte	30

2.4.6 Verdrängung des <sup>3</sup> H-PN 200-110 mit steigender Konzentration von Nifedipin	31
2.5 Patientendaten	32
2.6 Statistische Erhebungen	33
2.7 Geräte und Chemikalien	34
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>36</b>
3.1 Festlegung der Versuchsbedingungen in den Radioligandenbindungsexperimenten am Ryanodinkanal	36
3.1.1 Wahl der Inkubationszeit	36
3.1.2 Proteinabhängigkeit der Rezeptordichte	37
3.1.3 Calciumabhängigkeit der Ryanodinbindung	38
3.2 Calciumabhängigkeit der Ryanodinbindung in ischämischem und reperfundierten Myokard	40
3.2.1 Calciumabhängigkeit der Ryanodinbindung : Ischämie versus Kontrolle	40
3.2.2 Calciumabhängigkeit der Ryanodinbindung: Reperfusion versus Kontrolle	41
3.3 Dichtebestimmung der Calciumfreisetzungskanäle in ischämischem und reperfundierten Myokard	42
3.3.1 Dichte der Calciumfreisetzungskanäle: Ischämie versus Kontrolle	42
3.3.2 Dichte der Calciumfreisetzungskanäle: Reperfusion versus Kontrolle	45
3.4 Festlegung der Versuchsbedingungen in den Radioligandenbindungsexperimenten am L-Typ-Calciumkanal	48
3.4.1 Assoziation des Rezeptor-Ligandenkomplexes	48
3.4.2 Proteinabhängigkeit der Rezeptordichte	49

3.4.3 Verdrängung des $^3\text{H}$ -PN 200-110 mit steigender Konzentration an Nifedipin	50
3.5 Dichtebestimmung der L-Typ Calciumkanäle in ischämischem und reperfundierten Myokard	52
3.5.1 Dichte der L-Typ Calciumkanäle: Ischämie versus Kontrolle	52
3.5.2 Dichte der L-Typ Calciumkanäle: Reperfusion versus Kontrolle	55
<b>4. Diskussion</b>	<b>57</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>62</b>
<b>6. Quellenangaben</b>	<b>64</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>69</b>
A Danksagung	69
B Lebenslauf	70
C Publikationsliste	71

## **1. Einleitung**

Die ischämische Myokardschädigung gefolgt von anschließender Reperfusion spielt eine Rolle in der Entstehung einiger wichtiger klinisch-kardiologischer Phänomene, die unter dem Oberbegriff der postischämischen Dysfunktion zusammengefaßt werden können.

Die Pathophysiologie dieser ischämischen Myokardschädigung beruht im wesentlichen auf zwei sich ergänzenden Hauptmechanismen:

1. Der Freisetzung von Oxyradikalen, die als Sauerstoff-induzierte freie Radikale einen oxidativen Streß auf Endothel und Myokard ausüben (Myers und Roberts 1985 )
2. Einer Veränderung der intrazellulären Calciumhomöostase, die vor allem aus einer transienten Calciumüberladung der Zelle (Steenbergen und London 1987 ), mit konsekutiver Störung der elektromechanischen Kopplung (Kusuoka und Marban 1990 ) und einer reduzierten Sensitivität der Myofibrillen gegenüber Calcium besteht (Kusuoka und Marban 1987 ).

### **1.1 Calciumcycling im Kardiomyozyten**

Die Plasmamembran der Kardiomyozyten umschließt nicht nur die Zelle, sondern formt Einstülpungen in den Zellraum, sogenannte T-Tubuli. Intrazellulär sind die T-Tubuli den terminalen Zisternen des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) unmittelbar benachbart. Das SR ist das Hauptcalciumreservoir des Kardiomyozyten und spielt eine Schlüsselrolle im intrazellulären Calciumcycling. Eine Verbindung zwischen beiden Strukturen wird durch eine "Fuß-Struktur" hergestellt (Inui 1987). Diese besteht aus Homotetrameren mit einem Molekulargewicht von 565 kDa (Zorzato 1990), die die Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums durchdringen und darin den Calcium Freisetzungskanal des Sarkoplasmatischen Retikulums bilden. Auf der gegenüberliegenden Seite haften sie an der Innenseite der Plasmamembran. In unmittelbarer Nähe zu diesen Strukturen durchdringen spannungsabhängige L-Typ Calciumkanäle die Plasmamembran. Energieabhängiger Ionentransport zwischen Cytosol und Extracellularraum wird durch die transmembranen

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger geleistet. Im longitudinalen Anteil des SR befindet sich die  $\text{SR-Ca}^{2+}$ -ATPase mit ihrem Regulatorprotein Phospholamban.

Werden Myokardfasern durch ein ankommendes Aktionspotential elektrisch erregt, kontrahiert die Arbeitsmuskulatur des Herzens, was als Elektromechanische Kopplung bezeichnet wird.

Wenn ein depolarisierendes Aktionspotential über das Sarkolemm die T-Tubuli erreicht, öffnen sich während der Plateauphase des Aktionspotentials die L-Typ Calcium Kanäle. Das einströmende Calcium bindet an den Calciumfreisetzungskanal des Sarkoplasmatischen Retikulums, der aufgrund seiner hohen Affinität zu dem Pflanzenalkaloid Ryanodin auch als Ryanodin-sensitiver Calciumkanal bezeichnet wird (Inui 1987; Imagawa 1987; Lai 1988). Das dort gebundene Calcium triggert so eine schnelle Freisetzung des im SR gespeicherten Calciums (Fabiato 1983). Die Konzentration von Calcium im Zytoplasma steigt von  $10^{-7}$  mol/l auf  $10^{-5}$  mol/l an, was als Calcium-Transient bezeichnet wird. Der Anstieg der freien Calciumionenkonzentration im Zytoplasma führt über die Bindung des Calciums an Troponin C zur Ausbildung der Aktin-Myosin-Querbrücken und damit zur Kontraktion der Zelle. Durch die in der longitudinalen Membran des SR integrierte  $\text{SR-Ca}^{2+}$ -ATPase wird Calcium nach erfolgter Dissoziation von Troponin C in das SR resequestriert (gegen seinen Gradienten unter ATP- Hydrolyse), was die Relaxation des Myozyten erlaubt. Die  $\text{SR-Ca}^{2+}$ -ATPase-Aktivität wird durch Phospholamban, ein integrales Membranprotein bestehend aus fünf Untereinheiten von je 7 kDa (Wegener 1986) gesteuert. Wird dieses Protein durch eine cAMP-aktivierte ( Protein-Kinase A) oder durch eine Calcium-calmodulinaktivierte Kinase phosphoryliert, dissoziiert es von der  $\text{SR-Ca}^{2+}$ -ATPase, wodurch seine hemmende Wirkung entfällt und die Calcium-Aufnahme durch die  $\text{SR-Ca}^{2+}$ -ATPase in das SR aktiviert wird (Kirchberger 1974; James 1989).

Calcium im SR ist an das anionische Protein Calsequestrin (Movsesian 1990) gebunden und wird so gespeichert (MacLennan 1971).

Die Calciumhomöostase wird durch die transmembranen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Exchanger aufrechterhalten, die eine Calciummenge entsprechend dem Einstrom in die Zelle während des Aktionspotentials wieder aus der Zelle transportieren (Barry 1993).

## 1.2 Einfluß von Ischämie und Reperfusion auf das intracelluläre Calciumcycling

Verschiedene Studien demonstrierten, daß eine kurzzeitige Ischämie unterschiedliche Phänomene an den einzelnen Schaltstellen der intracellulären Calciumhomöostase auslöst: Krause und Hess (1984) konnten eine reduzierte Calcium-Aufnahme in das Sarkoplasmatische Retikulum durch die SERCA als auch eine Verminderung der Calcium-Freisetzung durch den Ryanodin-sensitiven Calciumfreisetzungskanal nach Phasen prolongierter Ischämie nachweisen. Zucchi und Barsotti (1996) berichteten eine Verminderung der Calcium-Aufnahme in das Sarkoplasmatische Retikulum während Ischämie und nach Reperfusion in humanem rechtsatrialen Myokard. Die Dichte der Ryanodin-sensitiven Calciumfreisetzungskanäle in ischämischem und reperfundiertem Rattenmyokard ist vermindert (Zucchi und Mariani 1995).

Myokardischämie verursacht auch eine Reduktion der Expression verschiedener Membranrezeptoren und Ionen-Kanäle: z.B. der  $\alpha$ - und  $\beta$  adrenergen Rezeptoren (Maisel und Insel 1987), der  $A_2$  Adenosin Rezeptoren (Zucchi und Ronca 1992) sowie der Endothelin-1 Rezeptoren (Liu und Nayler 1990). Kardiale Dihydropyridin-Rezeptoren entsprechen den spannungsgesteuerten sarkolemmalen L-Typ Calciumkanälen, die als downreguliert während Phasen myokardialer Ischämie beschrieben sind (van Amsterdam und Zaagsma 1990; Nayler und McKelvie 1985). Zucchi und Mariani (1995) fanden allerdings keine Dichtereduktion der Dihydropyridin-Bindungsstellen in ischämischem Rattenmyokard.

Diese Arbeiten legen nahe, daß eine Dysfunktion oder eine Downregulierung der Funktion des Sarkoplasmatischen Retikulums in ischämischem und reperfundiertem Myokard vorliegt.

Die Ergebnisse der Arbeiten über die Dichte der L-Typ Calciumkanäle während Ischämie sind allerdings kontrovers. Es gibt keine Daten über die Rezeptordichte während Ischämie und nachfolgender Reperfusion.

### 1.3 Ziel der Studie

Ziel dieser Studie war die Dichtebestimmung und Calciumsensitivität des Ryanodin-sensitiven Calciumfreisetzungskanals des Sarkoplasmatischen Retikulums sowie die Dichtebestimmung des sarkolemmalen L-Typ Calcium Kanals in ischämischem und reperfundierten humanen rechtsatrialen Myokard.

Die Quantifizierung dieser Kanäle erfolgte mit Hilfe der Radioligandenbindung.

Durch die Untersuchung dieser beiden wichtigen Schaltstellen im Calciumcycling des Kardiomyozyten sollte die Hypothese der an mehreren Schlüsselstellen gleichzeitig bestehenden Dysregulation der Calciumhomöostase weiter evaluiert werden.

Die Rezeptordichte des Ryanodin-sensitiven Calciumfreisetzungskanals bestimmt durch Radioligandenbindung gibt Aufschluß über eine potentielle Downregulierung dieses Kanals während Ischämie und Reperfusion, da die Bindung des radioaktiv markierten Ryanodins nur an den aktivierbaren Calciumfreisetzungskanal erfolgt. Diese Daten würden einen weiteren Aspekt der postulierten Dysfunktion des Sarkoplasmatischen Retikulums in der Ätiologie der ischämischen Myokardverletzung darstellen.

Die Dichte der sarkolemmalen L-Typ Calciumkanäle in ischämischem und reperfundiertem humanen Myokard ist nicht bekannt, so daß durch ihre Bestimmung eine erste Annäherung an die Frage der Involvierung dieser Kanäle in der Dysregulation der intracellulären Calciumhomöostase des ischämisch geschädigten Kardiomyozyten ermöglicht wird.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Aufbau der Studie**

Die Studie besteht aus zwei experimentellen Ansätzen:

A.: Bestimmung der Dichte des Ryanodin sensitiven Calciumkanals in Homogenaten ischämischen und reperfundierten, rechtsatrialen humanen Myokards.

B: Bestimmung der Dichte des spannungsabhängigen L-Typ Calcium Kanals in Homogenaten ischämischen und reperfundierten, rechtsatrialen humanen Myokards.

### **2.2 Patienten und Probenentnahme**

Humanes rechtes Vorhofmyokard wurde bei 25 Patienten, die sich einer Operation am offenen Herzen unter Einsatz extrakorporaler Zirkulation unterzogen, aus dem rechten Atrium gewonnen. Gewebe wurde von 14 Patienten mit koronarer Herzerkrankung und Indikation zur artokoronaren Bypassoperation und 6 Patienten mit koronarer Herzerkrankung und Aortenklappenstenose mit Indikation zur Aortokoronaren Bypassoperation und gleichzeitigem Aortenklappenersatz sowie von 2 Patienten mit Mitralklappenstenose, bzw. 3 Patienten mit Aortenklappenstenose mit Indikation zum isolierten Herzklappenersatz entnommen.

Nach einer medianen Sternotomie und Eröffnung des Perikards wurde der totale kardiopulmonale Bypass durch extrakorporale Zirkulation etabliert sowie eine milde Hypothermie induziert ( 28°C).

Nach Abklemmung der Aorta wurde die Aortenwurzel mit Cardioplegie-Lösung (Bretschneider) perfundiert und somit der schnelle komplette diastolische Arrest des Herzens erzielt.

Bei jedem Patienten wurden an jeweils zwei Zeitpunkten Biopsien (ca.100 mg) aus dem rechten Herzohr entnommen:

1. Nach 90 Minuten cardioplegischer Ischämie und
2. Nach 30 Minuten Reperfusion (nach Wiedereröffnung des Aortenflusses)

Als Kontrolle diente Gewebe, das vor Anlage der extrakorporalen Zirkulation nach Kanülierung des rechten Vorhofs entnommen wurde.

Das Gewebe wurde sofort im Operationssaal in flüssigem Stickstoff eingefroren und innerhalb einer Woche analysiert.

## **2.3 Dichtebestimmung des Ryanodin-sensitiven Calciumfreisetzungskanals des SR (Rya-CRK)**

### **2.3.1 Prinzip der Radioligandenbindung**

Die Radioligandenbindung ist eine Methode zur quantitativen Untersuchung von Rezeptoren in Geweben oder an Zellen. Sie erlaubt die Bestimmung der Rezeptordichte, wenn zusätzlich eine geeignete Bezugsgröße wie z.B. der Proteingehalt der Probe gemessen wird, darüberhinaus ist aber auch die Messung der Affinität verschiedener Liganden zum Rezeptor möglich. Im Falle der Bindung von tritiiertem Ryanodin an den Rya CRK handelt es sich um eine präferentielle Bindung des Ryanodin an den Rezeptor im offenen Zustand, so daß durch die  $^3\text{H}$ -Ryanodin Bindung eine Aussage über den "Gating State" des Rya CRK getroffen werden kann (Holmberg und Williams 1990). Gegebenenfalls können auch die Anteile verschiedener Rezeptorsubtypen analysiert werden.

Während der Inkubation der rezeptortragenden Membran mit einem radioaktiv markierten Liganden bindet sich dieser entsprechend seiner chemischen Spezifität an den ihn erkennenden Rezeptor. Die Bindung ist von der Konzentration des Radioliganden abhängig und gehorcht einer Sättigungscharakteristik. Die Analyse dieser Sättigungskurve erlaubt die Berechnung der Rezeptordichte und der Affinität des Radioliganden zum Rezeptor.

In dieser Studie wurde zur Untersuchung der Rya-CRK  $^3\text{H}$ -Ryanodin der Firma NEN-Dupont eingesetzt.

Während der Inkubation bindet das  $^3\text{H}$ -Ryanodin einerseits an die Rya-CRK im Homogenat, andererseits löst sich das  $^3\text{H}$ -Ryanodin auch in den Zellmembranen (Ansätze A). Durch Filtration erfolgt nun die Trennung der noch verbliebenen freien Aktivität, die nicht an die Membran gebunden ist. Die unter diesen Bedingungen zustande kommende Bindung heißt totale Bindung (TB) des  $^3\text{H}$ -Ryanodin an der Zellmembranpräparation. Diejenige Bindung von  $^3\text{H}$ -Ryanodin, die nach Zusatz eines Überschusses des nicht radioaktiv markierten Alkaloids Ryanodin noch meßbar ist (Ansätze B), wird als unspezifische Bindung (UB) definiert, da nicht radioaktiv markiertes Ryanodin in geeigneter Konzentration (siehe unten) das tritiierte Ryanodin von seiner spezifischen Bindungsstelle am Rezeptor, nicht dagegen aus seiner unspezifischen Bindung in der Membran verdrängt. Wieder wird durch Filtration die freie Aktivität von der gebundenen getrennt. Die spezifische Bindung ergibt sich dann als totale Bindung minus unspezifische Bindung:

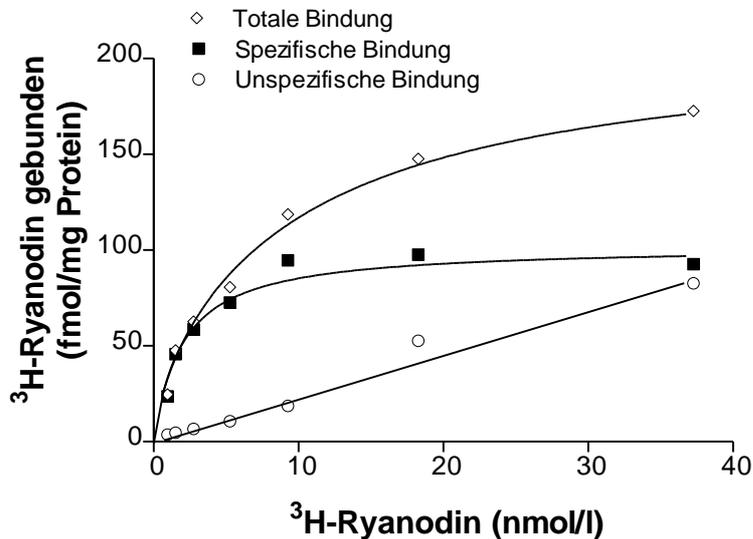
$$\text{SB} = \text{TB} - \text{UB}.$$

Zur Bestimmung der Rezeptordichte werden TB und UB bei verschiedenen Ligandenkonzentrationen gemessen. Wie Abbildung 1 zeigt, steigt die totale Bindung mit steigender Ligandenkonzentration zunächst steil, später flacher und linear an, während die Kurve der unspezifischen Bindung linear und flach ansteigt. Die Differenz der beiden Ansätze, die spezifische Bindung, zeigt die typische Sättigungscharakteristik. Die Bindung strebt asymptotisch einem Maximalwert zu, der  $B_{\text{max}}$  genannt wurde. Dieser wurde durch computergestützte Approximation durch nichtlineare Regression (Summe der kleinsten Quadrate) der Funktion

$$B = B_{\text{max}} \times L / (K_D + L)$$

an die Daten ermittelt. Dabei war B die bei der jeweiligen Ligandenkonzentration L gemessene spezifische Bindung.  $K_D$  wurde durch die nichtlineare Regression ebenfalls approximiert und entsprach derjenigen Ligandenkonzentration, bei der die spezifische Bindung halbmaximal war. Diese Ligandenkonzentration ist ein Maß für die Affinität des Liganden zum Rezeptor.

## Repräsentatives Bindungsexperiment



Die Abbildung 1 zeigt ein repräsentatives Bindungsexperiment aus der Referenzgruppe. Die Abbildung zeigt die totale Bindung (TB, Rauten), die in Abwesenheit von Verdränger zustande kam, und die unspezifische Bindung (UB, Kreise) in Anwesenheit von  $10 \mu\text{mol/l}$  unmarkiertem Ryanodin. Die spezifische Bindung (SB, Quadrate) wurde als Differenz TB-UB errechnet und zeigt mit steigender Ligandenkonzentration das Verhalten einer Sättigungskurve. Sie strebt asymptotisch einem Maximalwert entgegen ( $B_{\text{max}} = 32 \text{ fmol/mg}$ ), der der Rezeptordichte entspricht. Diejenige Konzentration von tritiiertem Ryanodin, bei der die spezifische Bindung halbmaximal ist, heißt  $K_D$ -Wert (hier  $0.921 \text{ nmol/l}$ ). Abszisse: Konzentration von tritiiertem Ryanaodin in pmol/l. Ordinate: Gebundenes tritiiertes Ryanodin in fmol gebundenes tritiiertes Ryanodin/ mg Membranprotein.

Aber auch vor der Möglichkeit der computergestützten nichtlinearen Regression gelang die Ermittlung von  $B_{max}$  und  $K_D$  graphisch durch die linearisierte Auswertung nach Scatchard (1949).

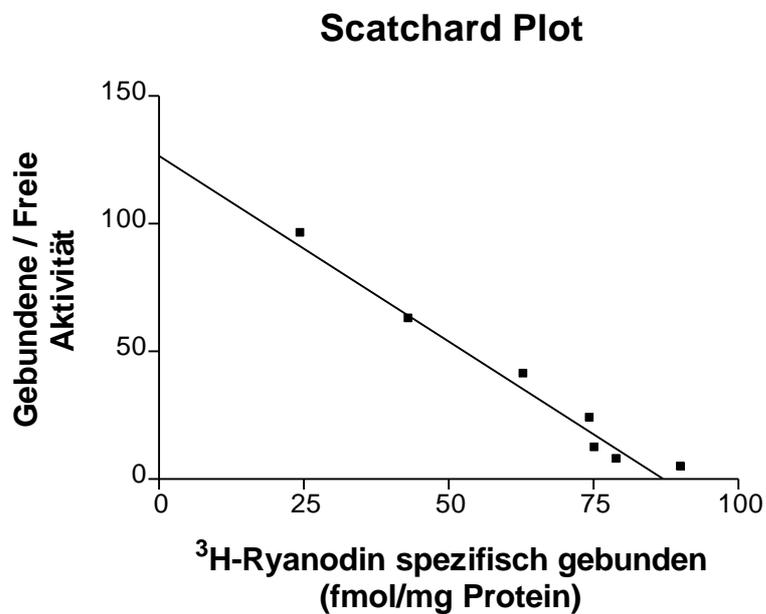


Abbildung 2 zeigt die Scatchard Analyse des in Abbildung 2 gezeigten Bindungsexperimentes. Abszisse: Spezifisch gebundenes  $^3\text{H-Ryanodin}$  in fmol / mg Membranprotein. Ordinate: Quotient aus gebundener (fmol/assay) und freier Aktivität (pmol/l). Der Schnittpunkt der entstehenden Geraden mit der Abszisse stellt die gemessene Rezeptordichte dar (88 fmol/mg). Die Affinität des Radioliganden  $^3\text{H-Ryanodin}$  zum Calciumfreisetzungskanal des Sarkoplasmatischen Retikulums ergibt sich aus der Steigung der Geraden:  $K_D = -1 / \text{Slope} = 0.98 \text{ nmol/l}$ . Slope ist die Steigung der Geraden.

Dieser Auswertung liegt das Massenwirkungsgesetz zugrunde:

$$(1) \quad [L] \times [R] / [LR] = K_D$$

Hierbei ist: [L] = Konzentration des freien Liganden

[R] = Konzentration des nicht besetzten Rezeptors

$[LR]$  = Konzentration des Ligand-Rezeptor-Komplexes

$K_D$  = Dissoziationskonstante für die Bindung des Liganden an den Rezeptor

Durch Umformung erhält man aus (1):

$$(2) \quad [LR] / [L] = 1 / K_D \times [R]$$

$[LR]$  entspricht der gemessenen spezifischen Bindung (B),  $[L]$  der freien Aktivität des Liganden (F).  $[R]$  entspricht der Differenz der maximalen spezifischen Bindung ( $B_{max}$ ) und der bei der Ligandenkonzentration L gemessenen spezifischen Bindung (B):  $[R] = B_{max} - B$ .

Damit ergibt sich aus (2):

$$(3) \quad B / F = -1 / K_D \times B + B_{max} / K_D$$

Wird der Quotient aus der spezifischen und der freien Aktivität (B/F) über der spezifischen Aktivität (B) angetragen, so ergibt sich eine Gerade mit der Steigung  $-1 / K_D$  und dem x-Achsenabschnitt  $B_{max}$ .

## **Gewebeaufbereitung**

Das humane Myokard wurde direkt nach Entnahme im Operationssaal in flüssigem Stickstoff gefroren (Latenz maximal 30 s) und dann bei  $-80^{\circ}\text{C}$  weiter gelagert. Die Bindungsexperimente wurden in einem Zeitraum von 8 Tagen nach Entnahme durchgeführt. Zu Beginn des Versuches wurde das Gewebe rasch gewogen. Die Einwaage betrug  $100 \pm 2$  mg ( $n = 40$ ). Anschließend wurde das Gewebe sofort in 5 ml eiskaltem Homogenisationspuffer (Bindungspuffer A) aufgenommen. Es erfolgte die Zerkleinerung mit dem Ultra-Turrax (kleiner Schaft) unter Eiskühlung (alle Arbeitsschritte bei  $4^{\circ}\text{C}$ ) nach folgendem Schema:

Drei Zerkleinerungsschritte von je 20 Sekunden Dauer bei 17000 rpm mit jeweils 20s Kühlpause nach jedem Schritt

Der Turrax-Schaft wurde nach den drei Zerkleinerungsschritten mit 1ml Homogenisationspuffer nachgespült. Es erfolgte die weitere Homogenisation in einem 30ml Glas-Teflon Pottergefäß mit 25 Hüben bei 1100 rpm. Anschließend wurde das Gefäß mit weiteren 2 ml Puffer gespült, welche dem Homogenat hinzugefügt wurden.

### 2.3.3 Proteinbestimmung

Das in den Membranpräparationen enthaltene Protein diente als Bezugsgröße für die Ryanodinrezeptorkanaldichte. Die Bestimmung des Proteins erfolgte nach der Methode von Bradford (1976), bei der durch die Firma Bio-Rad erhältliche Reagenzien genutzt werden. Sie beruht auf der Bindung des Reagenz Coomassie Brilliant Blue G250 an Protein. Der entstehende Farbkomplex ist photometrisch bei 595 nm bestimmbar. Als Standard diente  $\gamma$ -Globulin in einer Konzentration von 70 - 700  $\mu\text{g/ml}$ . Aus der entstandenen Standarddeichkurve wurden die Probenproteinkonzentrationen erhalten. Alle Messungen erfolgten als Doppelbestimmungen.

Die Verdünnungsreihe des Standards ( $\gamma$ -Globulin) wurde wie folgt pipettiert:

Bidest ( $\mu\text{l}$ )	$\gamma$ -Globulin (1,4mg/ml) ( $\mu\text{l}$ )	Konzentration $\gamma$ -Globulin ( $\mu\text{g/ml}$ )
380	20	70
360	40	140
320	80	280
280	120	420
240	160	560
200	200	700

Je 100  $\mu\text{l}$  des verdünnten Standards oder der Probe wurden mit 5 ml Farbreagenz gründlich gemischt (Vortex) und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Anschließend wurden sie erneut durchmischt, in Küvetten überführt und die Extinktion bei 595 nm gemessen.

### 2.3.4 Durchführung des Bindungsexperimentes

Der Radioligand  $^3\text{H}$ -Ryanodin, das Myokardhomogenat und das nicht radioaktiv markierte native Ryanodin wurden im Bindungspuffer A (998 mmol/l KCl, 100 $\mu\text{mol/l}$  CaCl<sub>2</sub>, 20 mmol/l HEPES pH-Abgleich mit 1 N KOH auf pH 7,40) bei 4°C angesetzt.

Ein Aliquot des Myokardhomogenats mit 90 - 110  $\mu\text{g}$  Protein in 150  $\mu\text{l}$  Bindungspuffer A wurde mit  $^3\text{H}$ -Ryanodin in einem Endvolumen von 250  $\mu\text{l}$  für 90 min in einem 37°C warmen Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert.

Pipettierschema:	Ansätze A (TB)	Ansätze B (UB)
Bindungspuffer A:	50 $\mu\text{l}$	-
Ryanodin ( $5 \times 10^{-5}$ mol/l):	-	50 $\mu\text{l}$
$^3\text{H}$ -Ryanodin (0,5 - 40 nmol/l):	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
Membranpräparation (90-110 $\mu\text{g}$ Protein)		
zum Start der Reaktion:	150 $\mu\text{l}$	150 $\mu\text{l}$
Gesamtvolumen:	250 $\mu\text{l}$	250 $\mu\text{l}$

In den Ansätzen B betrug die Endkonzentration des unmarkierten Ryanodins also  $10^{-5}$  mol/l. Die Ansätze A und B wurden in jedem Experiment in Doppelbestimmung mit sechs verschiedenen Konzentrationen von  $^3\text{H}$ -Ryanodin (0,5 - 40 nmol/l) angesetzt. Die Inkubation wurde durch Verdünnen des Inkubationsansatzes mit 4 ml eisgekühltem Waschpuffer (Bindungspuffer A) gefolgt von zügiger Filtration durch Whatman GF/C Glasfaserfilter mit Hilfe eines Zellsammlers beendet. Dieser Zellsammler ist eine Vorrichtung, mit der der Inhalt von 12 Proben gleichzeitig über eingelegte Filter abgesaugt werden kann. Er ermöglicht auch durch eine Umstellung von Saugen auf Pumpen ein zusätzliches Ausspülen und Absaugen der Probenröhrchen. In diesem Versuchsaufbau wurden die Proben dreimal mit je 4ml Bindungspuffer über die Glasfilter gespült. Die Radioaktivität der Filter wurde mit einem  $\beta$ -Counter mit Hilfe der Szintillations-Spektrometrie bestimmt. Das Prinzip dieser Methode

basiert darauf, daß die schwach radioaktiven  $\beta$ -Teilchen (Tritium =  $\beta$ -Strahler) mit speziellen in der Szintillationsreagenz befindlichen Molekülen zusammenstoßen, deren Elektronen durch diesen Zusammenstoß in einen höheren Energiezustand gebracht werden und somit beim Zurückfallen in den Ausgangszustand Energie in Form von Licht abgeben, welches dann als Lichtimpuls detektiert werden kann. Der  $\beta$ -Counter gibt das Ergebnis in “counts per minute, cpm” an. Die tatsächlichen radioaktiven Zerfälle pro Minute (dpm = desintegrations per minute) des zu messenden Isotops können nur rechnerisch bestimmt werden nach:

$$\text{dpm} = \text{cpm} / \text{Zählausbeute}$$

Soll also die absolute Radioaktivität bestimmt werden, muß die genaue Zählausbeute bekannt sein. Eine Zählausbeute die deutlich geringer als 100% ist (hier 40%) ergibt sich insbesondere durch Strahlungsverluste innerhalb des Meßgerätes durch löschende oder neutralisierende (“quenched”) Substanzen, die entweder in der Probe und/oder dem Szintillationscocktail enthalten sind. Somit kann eine Bestimmung der Zählausbeute nur durch einen Korrekturfaktor, die sogenannte “Quench-Korrektur” erfolgen. Dazu wird eine radioaktive Probe, deren dpm bekannt sind, zunehmend mit quencheden Substanzen verunreinigt und die abnehmenden cpm aufgezeichnet. Aus den gespeicherten Werten der cpm des ersten ungequencheden Standards, der Quenchkurve und einem externen radioaktiven Standard, der im  $\beta$ -Counter integriert ist (hier:  $^{226}\text{Radium}$ ) und dessen Aktivität bekannt ist, läßt sich so die Zählausbeute später für jede Probe genau bestimmen.

Eine diesbezügliche Quenchkurve wurde bei der Etablierung der  $^3\text{H}$ -Ryanodin-Bindung aufgenommen.

Beispielhaft wurde in der Abbildung 1 die so erhaltenen Kurven für die totale, die unspezifische und die spezifische Bindung dargestellt. Hier ergab sich eine  $B_{\text{max}}$  von 88 fmol/mg und ein  $K_D$ -Wert von 0.98 nmol/l.

Es wurde die Beeinflußbarkeit der Meßergebnisse von folgenden Versuchsparametern untersucht:

**1. Inkubationszeit**

**2. Proteinabhängigkeit der Rezeptordichte**

**3. Calciumabhängigkeit der Ryanodinbindung**

**2.3.5. Wahl der Inkubationszeit**

Um eine Aussage über die Rezeptordichte mit Hilfe der spezifischen Aktivität treffen zu können, müssen alle Rezeptoren mit einem Liganden besetzt sein. Dies wird durch eine Sättigung der Lösung mit einer hohen Konzentration an  $^3\text{H}$ -Ryanodin erreicht. Vorher muß jedoch bestimmt werden, wie lange der Lösungsansatz mit  $^3\text{H}$ -Ryanodin inkubiert werden muß, bis ein Equilibrium und somit eine vollständige Besetzung aller Rezeptoren mit einem Liganden erfolgt ist.

Es wurden Versuchsansätze nach oben beschriebener Gewebeaufbereitung mit einer  $^3\text{H}$ -Ryanodin-Konzentration von 20 nmol/l über folgende Zeiträume inkubiert:

**[min.]: 2,5- 5 - 10 - 15 - 30 - 45 - 60 - 90 - 120 - 150 - 180 -**

Die Reaktion wurde durch Filtration mit dem Zellsammler wie oben beschrieben beendet.

Die Proteinkonzentration betrug 98 µg/Assay

### **2.3.6 Proteinabhängigkeit der Rezeptordichte**

Um zu bestimmen, ob die Bindung des Liganden an den Rezeptor abhängig ist von der im Assay eingesetzten Menge an rezeptortragender Membran, wurde der Membraneinsatz pro Assay (Protein/Assay) variiert. Dazu wurden etwa 100 mg Gewebe homogenisiert und auf Proteinonzentrationen von 50-150  $\mu\text{g}/\text{Assay}$  eingestellt.

In den Routineversuchen wurde die Menge des pro Assay eingesetzten Proteins auf etwa 100  $\mu\text{g}/\text{Assay}$  eingestellt ( $96,8 \pm 5,5 \mu\text{g}/\text{Assay}$ ,  $n = 50$ ).

Die Gewebeweinwaage wurde bei allen Versuchen konstant gehalten ( $73 \pm 2 \text{ mg}$ ,  $n = 50$ )

### 2.3.7. Calciumabhängigkeit der Ryanodinbindung

Es ist bekannt, daß die  $^3\text{H}$ -Ryanodin-Bindung abhängig von der Konzentration an freiem  $\text{Ca}^{2+}$  ist. Mikromolares Calcium erhöht die Affinität des Rezeptors für Ryanodin ebenso wie die maximale Bindungskapazität ( $B_{\text{max}}$ ) (Pessah und Waterhouse 1986). Vor diesem Hintergrund untersuchten wir die Calciumabhängigkeit der Ryanodinbindung im rechtsatrialen Myokard. Es wurden 12 verschiedene freie Calciumionenkonzentrationen in den Homogenaten eingestellt:

**pCa = -log ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 9 - 8 - 7,3 - 7,0 - 6,7 - 6,6 - 6,5 - 6,3 - 6,0 - 5,7 - 5,0 - 4,0**

Um dies zu ermöglichen, erfolgte die Homogenisierung des Myokards in einem Bindungspuffer, der durch EGTA eine besondere Stabilisierung der Calciumionenkonzentration gewährleistet.

Zunächst wurden 3 Calciumstammlösungen angesetzt:

1. 20 mmol/l  $\text{CaCl}_2$
2. 50 mmol/l  $\text{CaCl}_2$
3. 100 mmol/l  $\text{CaCl}_2$

Jeweils 1 ml des Homogenates wurde zu nach folgendem Pipettierschema vorbereiteten Proben gegeben, so daß die 12 freien Calciumkonzentrationen im Bindungsansatz vorlagen. Die genaue Einstellung der freien Calciumionenkonzentrationen bzw. die Erstellung des Pipettierschemas erfolgte mittels eines speziellen Computerprogramms (Fabiato und Fabiato, 1988). Um auch nach Zugabe des Homogenates zu den jeweiligen Calciumkonzentrationen eine Konstanzhaltung der einzustellenden Calciumkonzentrationen zu gewährleisten, erfolgte jeweils direkt nach der Homogenatzugabe ein Abgleich mit KOH wie in folgendem Pipettierschema verdeutlicht:

pCa <sup>2+</sup>	Stamm 1 (µl)	Stamm 2 (µl)	Stamm 3 (µl)	Bidest ( µl)	KOH (mol/l)
9,0	-	-	-	20	-
8,0	10,8	-	-	9,2	0,15
7,3	-	14,9	-	5,1	0,3
7,0	-	-	10,3	9,7	0,45
6,7	-	-	12,6	7,4	0,6
6,6	-	-	13,3	6,7	0,6
6,5	-	-	13,8	6,2	0,6
6,3	-	-	14,7	5,3	0,6
6,0	-	-	15,5	4,5	0,6
5,7	-	-	15,9	4,1	0,6
5,0	-	-	16,5	3,5	0,6
4,0	-	-	18,1	1,6	0,6

Zu den Bindungsansätzen wurde eine konstante Menge von 20 nmo/l <sup>3</sup>H-Ryanodin gegeben. Es erfolgte eine Durchführung der Routineversuche mit einer Calciumkonzentration von 100 µmol/l.

## **2.4. Dichtebestimmung des L-Typ Calciumkanals**

### **2.4.1 Prinzip der Radioligandenbindung**

Das Prinzip der Radioligandenbindung ist unter 2.3.1 beschrieben.

### **2.4.2. Gewebeaufbearbeitung**

Da es bis jetzt keine Beschreibung der Radioligandenbindung am L-Typ Calciumkanal von humanem, rechtsatrialem Myokard in der Literatur gibt, mußte zunächst die geeignete Membranpräparation etabliert werden.

Verglichen wurden Modifikationen der Methoden von van Amsterdam und Zaagsma (Rattenmyokard, 1990) und Schmidt und Böhm (Humanes linksventrikuläres Myokard, 1993).

Es wurden die drei folgenden Membranpräparationen hinsichtlich ihrer Proteinrecovery und ihrer Rezeptorrecovery untersucht.

Bei allen drei Methoden wurde mit einer Gewebewäge von 100 mg gearbeitet (größere Gewebemengen konnten nicht aus dem rechten Atrium entnommen werden).

Alle Aufbearbeitungen erfolgten mit demselben Puffer:

Puffer:  $10^{-2}$  mol/l Trizma base, Abgleich mit 5 N HCl auf pH 7,4

Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C

#### **D)**

- a) Aufnehmen der zu untersuchenden Probe in 4 ml Puffer
- b) erste Homogenisation mit großem Ultraturaxschaft (höchste Stufe ca 15000 U/min.) 15s  
gefolgt von 20s Kühlpause, 3 Durchgänge, Nachspülen des Turaxschaftes mit 2 ml Puffer
- c) Zentrifugation mit 90 G für 15 Minuten
- d) Filtration durch 4lagige Gaze, Nachspülen mit 2 ml Puffer
- e) Zentrifugation mit  $5 \times 10^4$  G für 20 Minuten
- f) Abgießen des Überstandes
- g) Resuspendierung des Pellets in 2 ml Puffer mit kleinem Turaxschaft und niedrigster Stufe

## **II)**

- a) Aufnehmen der zu untersuchenden Probe in 4 ml Puffer
- b) erste Homogenisation mit großem Ultraturrxschaft 15s (höchste Stufe ca 15000 U/min.)  
gefolgt von 20s Kühlpause, 3 Durchgänge, Nachspülen des Turrxschaftes mit 2 ml Puffer
- c) Zentrifugation mit 90 G für 15 Minuten
- d) Filtration durch 4lagige Gaze, Nachspülen mit 2 ml Puffer
- e) Zentrifugation mit 75600 G für 40 Minuten
- f) Abgießen des Überstandes
- g) Resuspendierung des Pellets in 2 ml Puffer mit kleinem Turrxschaft und niedrigster Stufe

## **III)**

- a) Aufnehmen der zu untersuchenden Probe in 4 ml Puffer
- b) erste Homogenisation mit großem Ultraturrxschaft (höchste Stufe ca 15000 U/min.) 15s  
gefolgt von 20s Kühlpause, 3 Durchgänge, Nachspülen des Turrxschaftes mit 2 ml Puffer
- c) Zentrifugation mit 90 G für 15 Minuten
- d) Filtration durch 4lagige Gaze, Nachspülen mit 2 ml Puffer
- e) Überführung der Probe in ein Glaspottergefäß und Rehomogenisierung mit 20 Hüben bei  
ca 800 U/min.
- f) Zentrifugation mit 75600 G für 40 Minuten
- g) Abgießen des Überstandes
- h) Resuspendierung des Pellets in 2 ml Puffer mit kleinem Turrxschaft und niedrigster Stufe

Die Routineversuche wurden mit Membranpräparation II durchgeführt

### 2.4.3 Durchführung des Bindungsexperimentes

Der sarkolemmale L-Typ Calciumkanal besteht aus vier Untereinheiten ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  und  $\delta$ ). Von diesen ist die  $\alpha_{1C}$  Untereinheit diejenige, die den Angriffspunkt für die therapeutisch verwendeten Calciumkanalblocker, wie Dihydropyridine, Phenylalkylamine und Benzothiazepine, darstellt (Welling und Kass, 1993).

Als Radioligand wurde  $^3\text{H}$ -PN 200-100, ein Antagonist am 1,4 Dihydropyridinrezeptor (entsprechend der  $\alpha_{1C}$  Untereinheit) mit hoher Affinität und geringer unspezifischer Bindung, verwendet (Schmidt und Böhm, 1993).

A: Verdränger:

Als Verdränger wurde Nifedipin, ein 1,4 Dihydropyridin, eingesetzt.

Zunächst wurde für jedes Experiment ein frischer Nifedipin-Ansatz hergestellt. Die Halbwertszeit von Nifedipin bei UV-Licht in wäßriger Lösung beträgt 15 min, so daß diese Arbeiten unter weitgehendem UV-Lichtabschluß erfolgten.

Als Konzentration wurden  $10^{-5}$  mol/l Nifedipin gewählt (Schmidt und Böhm, 1993).

1. 17,3 mg Nifedipin wurden eingewogen und in 20 ml Ethanol aufgelöst unter Einsatz eines Magnetrührers.
2. Auffüllung mit 80 ml Puffer unter Einsatz einer Wärmeplatte bei  $40^\circ\text{C}$ .

Dieser Ansatz enthält die Konzentration  $10^{-4}$  mol/l und wurde 1:10 auf  $10^{-5}$  mol/l verdünnt (0,5 ml Nifedipin in 4,5ml Puffer).

Wichtig ist, daß der Nifedipin-Ansatz nur in Glasgefäßen erfolgen darf, da sonst keine vollständige Lösung erfolgt.

B Tritiiertes PN 200-110 als radioaktiver Ligand:

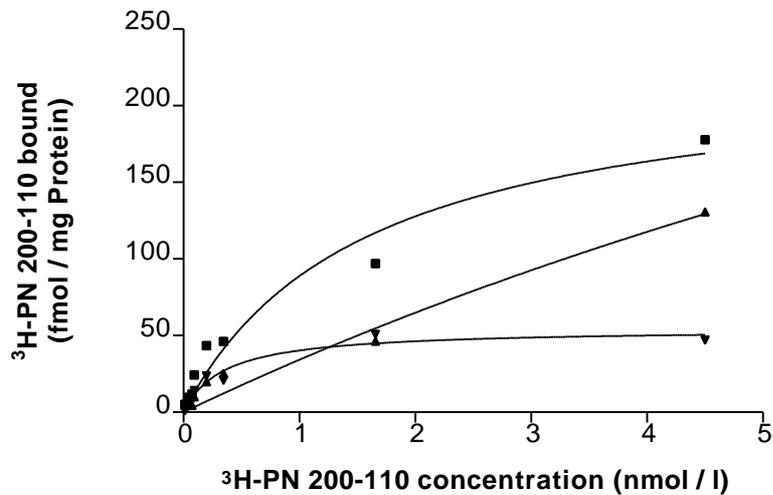
Der Radioligand  $^3\text{H}$ -PN 200-110, das Myokardhomogenat und das Nifedipin wurden im Bindungspuffer (s.o.) angesetzt.

Ein Aliquot des Myokardhomogenats mit 90 - 110  $\mu\text{g}$  Protein in 150  $\mu\text{l}$  Bindungspuffer wurde mit  $^3\text{H}$ -PN 200-110 in einem Endvolumen von 250  $\mu\text{l}$  für 45 min in einem  $37^\circ\text{C}$  warmen Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert.

Pipettierschema:	Ansätze A (TB)	Ansätze B (UB)
Bindungspuffer :	50 $\mu\text{l}$	-
Nifedipin ( $10^{-5}$ mol/l):	-	50 $\mu\text{l}$
$^3\text{H}$ -PN 200-110 (0,05 – 4,5 nmol/l):	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
Membranpräparation (90-110 $\mu\text{g}$ Protein)		
zum Start der Reaktion:	150 $\mu\text{l}$	150 $\mu\text{l}$
Gesamtvolumen:	250 $\mu\text{l}$	250 $\mu\text{l}$

Die Ansätze A und B wurden in jedem Experiment in Doppelbestimmung mit sechs verschiedenen Konzentrationen von  $^3\text{H}$ -PN 200-110 (0,05 – 4,5 nmol/l) angesetzt. Die Inkubation wurde durch Verdünnen des Inkubationsansatzes mit 4 ml eisgekühltem Waschpuffer (Bindungspuffer) gefolgt von zügiger Filtration durch Whatman GF/C Glasfaserfilter mit Hilfe eines Zellsammlers beendet. Dieser Zellsammler ist eine Vorrichtung, mit der der Inhalt von 12 Proben gleichzeitig über eingelegte Filter abgesaugt werden kann. Er ermöglicht auch durch eine Umstellung von Saugen auf Pumpen ein zusätzliches Ausspülen und Absaugen der Probenröhrchen. In diesem Versuchsaufbau wurden die Proben fünfmal mit je 4ml Bindungspuffer über die Glasfilter gespült. Die Radioaktivität der Filter wurde mit einem  $\beta$ - Counter mit Hilfe der Szintillations-Spektrometrie bestimmt. Das Prinzip dieser Methode ist oben beschrieben .

### repräsentatives Bindungsexperiment



Beispielhaft zeigt Abbildung 3 die so erhaltenen Kurven für die totale, die unspezifische und die spezifische Bindung. Hier ergab sich eine  $B_{\text{max}}$  von 52 fmol/mg und ein  $K_D$ -Wert von 7,5 pmol/l.

Es wurde die Beeinflussbarkeit der Meßergebnisse von folgenden Versuchsparametern untersucht:

- 1. Assoziation des Rezeptor-Ligandenkomplexes**
- 2. Proteinabhängigkeit der Rezeptordichte**
- 3. Verdrängung des  $^3\text{H-PN 200-110}$  mit steigender Konzentration von Nifedipin**

#### **2.4.4. Wahl der Inkubationszeit**

Um eine Aussage über die Rezeptordichte mit Hilfe der spezifischen Aktivität treffen zu können, müssen alle Rezeptoren mit einem Liganden besetzt sein. Dies wird durch eine Sättigung der Lösung mit einer hohen Konzentration an  $^3\text{H}$ -PN 200-110 erreicht. Vorher muß jedoch bestimmt werden, wie lange der Lösungsansatz mit  $^3\text{H}$ -PN 200-110 inkubiert werden muß, bis ein Equilibrium und somit eine vollständige Besetzung aller Rezeptoren mit einem Liganden erfolgt ist.

Es wurden Versuchsansätze wie oben beschrieben über folgende Zeiträume inkubiert:

**[min.]: 1,5- 3 - 6 - 12 - 25 - 45 - 60 - 90 - 120 - 150**

Die Reaktion wurde durch Filtration mit dem Zellsammler wie oben beschrieben beendet.

Die Proteinkonzentration betrug 98  $\mu\text{g}/\text{Assay}$

#### **2.4.5 Proteinabhängigkeit der Rezeptordichte**

Um zu bestimmen, ob die Bindung des Liganden an den Rezeptor abhängig ist von der im Assay eingesetzten Menge an rezeptortragender Membran, wurde der Membraneinsatz pro Assay (Protein/Assay) variiert. Dazu wurden 150 mg Gewebe nach Gewebeaufbearbeitung II (s.o.) und auf Proteinnkonzentrationen zwischen 50-150  $\mu\text{g}/\text{Assay}$  eingestellt.

Eine genauere Darstellung findet sich im Ergebnisteil.

In den Routineversuchen wurde die Menge des pro Assay eingesetzten Proteins auf etwa 100  $\mu\text{g}/\text{Assay}$  eingestellt ( $95,8 \pm 7,2 \mu\text{g}/\text{Assay}$ ,  $n = 25$ ).

Die Gewebeeinwaage wurde bei allen Versuchen konstant gehalten  $150 \pm 3 \text{ mg}$ ,  $n = 25$ )

#### **2.4.6. Verdrängung des $^3\text{H}$ -PN 200-110 mit steigender Konzentration von Nifedipin**

Der Bestimmung der Rezeptordichte mittels der Radioligandenbindung liegt, wie oben erläutert die Ermittlung von Unspezifischer-, Spezifischer- und Totaler Bindung zugrunde.

Um diese exakt bestimmen zu können, mußte die Frage geklärt werden, welche Konzentration an Nifedipin eingesetzt werden muß, um den zur vollständigen Verdrängung des  $^3\text{H}$ -PN 200-110 nötigen "Überschuß" zu gewährleisten (Kompetitive Verdrängung), denn nur die vollständige Verdrängung des titierten Antagonisten aus der Rezeptorbindung ermöglicht die genaue Ermittlung der unspezifischen Bindung.

Es wurden 28 verschiedene Konzentrationen an Nifedipin ( $5 \times 10^{-10}$ - $5 \times 10^{-4}$  mol/l) eingesetzt. Die Bestimmung der zugehörigen Totalen Bindung (ohne Verdränger) erfolgte als 4fach Bestimmung aus dem gleichen Homogenat. Zu jeder Probe wurde eine konstante Menge an  $^3\text{H}$ -PN 200-110 (10 nmol/l) gegeben.

Eine ausführliche Darstellung des Versuches findet sich im Ergebnisteil.

Im folgenden wurde eine Konzentration von  $10^{-5}$  mol/l Nifedipin zur Bestimmung der unspezifischen Bindung verwendet.

## 2.5 Patientendaten

Der genaue Zeitpunkt der Gewebeentnahme sowie der chirurgische Ablauf ist weiter oben beschrieben.

Insbesondere wurde darauf geachtet, keinen mit einem Calciumkanalblocker vorbehandelten Patienten einzuschließen.

Patienten Nr.	Alter (Jahre)	Diagnose	Intervention	EF (%)	Ischämiezeit (min.)	Medikation	Geschlecht
1	65	KHK	ACB (4 fach)	45	90	D, β-B, N	M
2	64	KHK	ACB (3 fach)	52	76	β-B, N	M
3	72	KHK + AS	ACB (3fach) + AKE	60	103	N	M
4	66	KHK	ACB (5 fach)	58	75	β-B, N	W
5	76	KHK+AS	ACB (3fach) + AKE	53	102	N, β-B	W
6	70	MS	MKE	50	80		M
7	68	KHK	ACB (4 fach)	48	93	D, β-B, N	M
8	72	KHK	ACB (2 fach)	52	78	ACE-H, β-B	W
9	67	MS	MKE	55	99		M
10	70	KHK+AS	ACB (2fach) + AKE	49	101	N	W
11	68	KHK+AS	ACB (3fach) + AKE	60	102	N, ACE-H	M
12	64	KHK	ACB (5 fach)	45	85	D, β-B, N, ACE-H	W
13	73	AS	AKE	57	92	β-B, ACE-H, M	W
14	73	KHK + AS	ACB (2 fach) + AKE	50	100	M, ACE-H	M
15	67	KHK	ACB (4 fach)	56	74	β-B, ACE-H, M, D	W
16	72	KHK	ACB (3 fach)	54	80	β-B, M, ACE -H	M
17	76	AS	AKE	60	76		M
18	65	AS	AKE	55	90		W
19	68	KHK	ACB (3 fach)	44	88	β-B, ACE-H, M	W
20	71	AS	AKE	59	84		M
21	65	KHK	ACB (5 fach)	49	101	M, ACE-H, β-B	M
22	71	KHK	ACB (3 fach)	56	78	β-B, M, ACE -H	W
23	68	KHK+AS	ACB (3 fach)+AKE	52	103	M	M
24	64	KHK	ACB (3 fach)	63	80	β-B, M, ACE -H	M
25	73	KHK	ACB (4 fach)	59	76	β-B, ACE-H, N	M

---

**69 ± 0.74                      14 ACB                      53.64 ± 1.05                      88.24 ± 2.12**

**6 AKE +ACB**

**2 MKE**

**2 AKE**

Tabelle 1 zeigt die genauen klinischen Parameter der 25 Patienten sowie die Mittelwerte mit Standardabweichung: KHK = koronare Herzerkrankung, AS = Aortenklappenstenose, MS = Mitralklappenstenose, ACB = Aortokoronare Bypassoperation, AKE = Aortenklappenersatz, MKE = Mitralklappenersatz, EF = Ejektionsfraktion, D = Digoxin, β-B = β-Blocker, N = Nitrate, M = Molsidomin, ACE-H = ACE-Hemmer.

Medikation bezieht sich auf die 24 h präoperativ bestehende Medikation.

## 2.6 Statistische Erhebungen

Alle Ergebnisse sind als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  mittlerer Fehler des Mittelwertes ( $x \pm$  SEM) angegeben. Die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) und die maximale Bindung des Liganden an den Rezeptor ( $B_{max}$ ) wurden durch Analysen der Bindungsdaten nach Scatchard (1949) erhalten, die mit Hilfe des Rechnerprogramms Inplot der Firma GraphPad (San Diego, USA) erstellt wurden (lineare Regression). Durch dasselbe Programm wurden auch die nichtlinearen Approximationen der Verdrängungen des  $^3\text{H}$ -Ryanodin durch unmarkiertes Ryanodin sowie des  $^3\text{H}$ -PN 200-110 errechnet. Alle Regressionen sind durch das Computerprogramm so errechnet worden, daß die Summe der Quadrate der Abstände der einzelnen Punkte am kleinsten war.

Die Mittelwerte zwischen den einzelnen Versuchsbedingungen wurden mit dem ungerichteten und unverbundenen t-Test verglichen. Eine Differenz zwischen zwei Werten mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0.05$  wurde als signifikant angesehen.

## 2.7 Chemikalien und Geräte

### Chemikalienliste

Calciumchlorid	Merck
Coomassie Farbstoff-Konzentrat	BIO-RAD
Ethanol 99%	Merck
EGTA Ethyleneglycol-bis( $\beta$ -minoethyl Ether)	Sigma
Gamma Globulin Eichstandard	BIO-RAD
HEPES (N[2-Hydroxyethyl]piperazine-N <sup>-</sup> -[2-ethanesulfonic acid])	Sigma
HCL	Merck
<sup>3</sup> H-Ryanodin	NEN-Dupont
<sup>3</sup> H-PN 200-110	NEN- Dupont
Kaliumchlorid	Merck
KOH 1 N	Merck
Natriumchlorid	Merck
NaOH 1 N	Merck
Nifedipin	Bayer
Ryanodin	Sigma
TRIZMA Base (tris[hydroxymethyl]amino methan)	Sigma

### Geräteliste

Cell Harvester	Brandel, Bibby Dunn
Digital pH-Meter 646	Knick
$\beta$ -Counter	Berthold
Magnetrührer + kombinierte Heizplatte	Janke und Kunkel
Photometer Ultraspect II	Berthold
Potter S+ Pottergefäß typ Elvjehjem	B Braun
Schüttelwasserbad (beheizbar)	GFL
Ultra-Turrax Modell T-25	Janke und Kunkel

Vortex Genie  
Zentrifuge 5415  
Zentrifuge Centrikon H-401 + Rotor A8.24  
Whatman GF/C Filter

Bender und Hobein  
Eppendorf  
Kontron-Hermle  
Bibby Dunn

### **Firmenverzeichnis**

B Braun  
Bender-Hobein  
Berthold  
Bibby Dunn  
BIO-RAD Laboratories GMBH  
BIO-Whitaker  
Eppendorf  
GFL (Gesellschaft für Labortechnik)  
Janke und Kunkel GMBH & Co KG  
Merck  
NEN-Dupont  
Sigma

Melsungen  
Zürich  
Wildbach  
Asbach  
München  
Heidelberg  
Hamburg  
Burgwedel  
Staufen  
Darmstadt  
Bad Homburg v. d. H.  
Deisenhofen

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Festlegung der Versuchsbedingungen in den Radioligandenbindungsexperimenten am Rya-CRK

##### 3.1.1. Wahl der Inkubationszeit

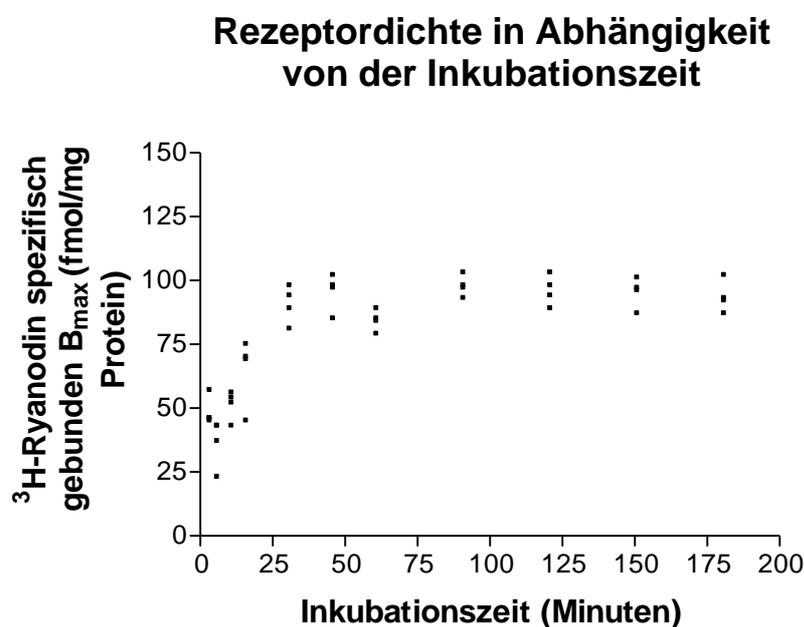


Abbildung 4 zeigt die Abhängigkeit der spezifischen Bindung von <sup>3</sup>H-Ryanodin an Homogenaten von der Inkubationszeit. Bei Inkubationszeiten kürzer als 45 min wurde das Equilibrium noch nicht erreicht. Die spezifische Bindung stieg bis zu einer Inkubationszeit von 50 min steil an. Von 60 min bis 180 min Inkubationszeit blieb die spezifische Bindung konstant, das Equilibrium war erreicht.

Die Routineexperimente wurden mit einer Inkubationsdauer von 90 min durchgeführt.

### 3.1.2. Proteinabhängigkeit der Rezeptordichte

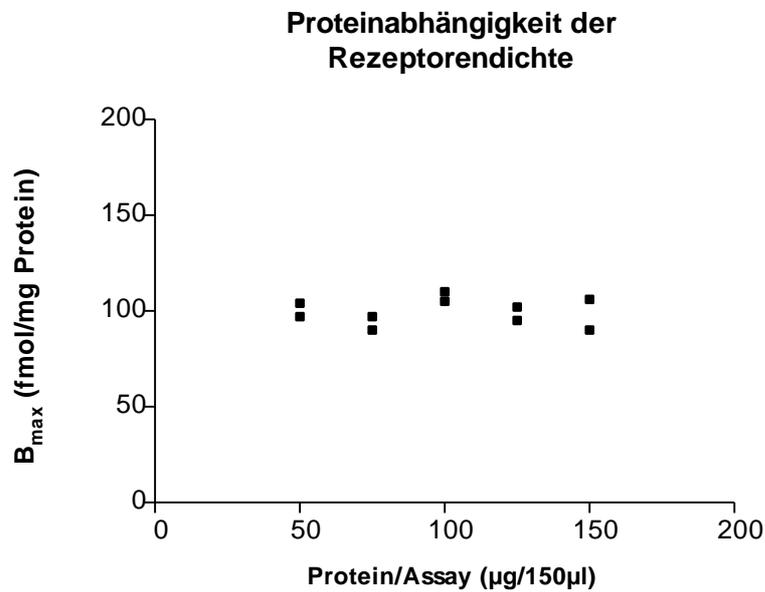


Abbildung 5 zeigt die Variation des Proteineinsatzes pro Bindungsassay. Die Messung erfolgte in Doppelbestimmung, und zeigt den nur geringen Einfluß der Proteinkonzentration im Bindungsansatz auf die maximale Rezeptordichte im Bereich zwischen 50-150  $\mu\text{g}$  Protein/ Assay

In den Routineexperimenten wurde eine Proteinkonzentration von 100  $\mu\text{g}/$  Assay verwendet

### 3.1.3 Calciumabhängigkeit der Ryanodinbindung

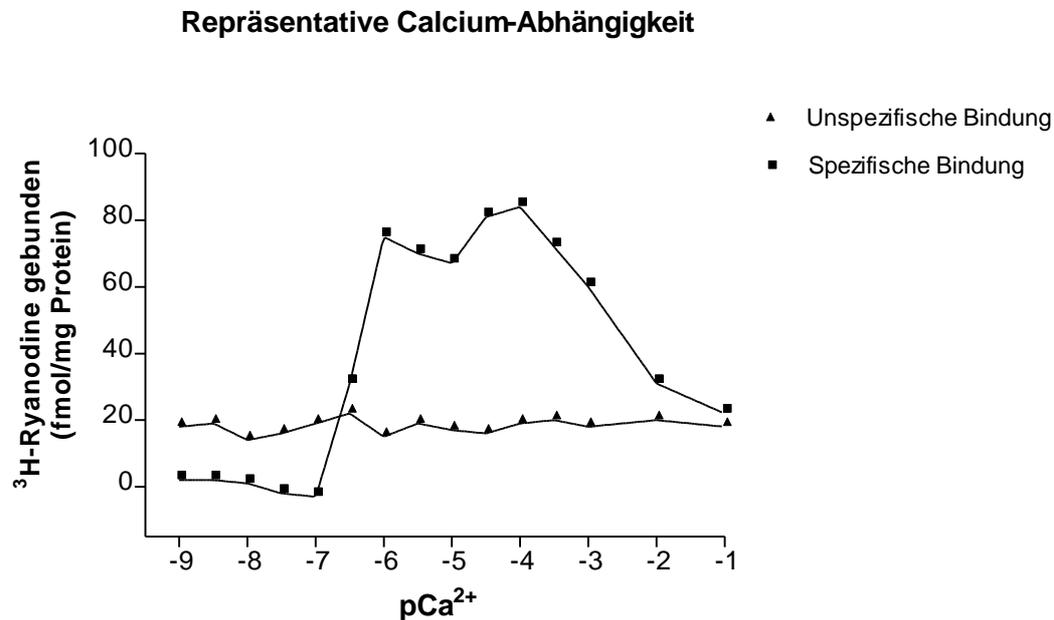


Abbildung 6 zeigt die Abhängigkeit der Bindung von <sup>3</sup>H-Ryanodin in einer Konzentration von 20 nmol/l an den Calcium-Freisetzungskanal von der Konzentration freier Calciumionen.

Dargestellt ist die Bindung von <sup>3</sup>H-Ryanodin (in fmol/ mg Protein) sowie die unspezifische Bindung gegen die Konzentration der freien Calciumionen. Jede Messung erfolgte in Doppelbestimmung, gezeigt sind Mittelwerte.

Bei einer Konzentration freier Calciumionen unter 0,1 µmol/l bindet Ryanodin nicht an den Calciumfreisetzungskanal. Steigt die Konzentration über diesen Wert, so nimmt die Bindung zu. Eine maximale Bindung herrscht in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,3-100 µmol/l. Bei einer Konzentration über 100 µmol/l nimmt die Bindung wieder stark ab. In den zur Quantifizierung des Calciumfreisetzungskanals verwendeten Puffern wurde die Calciumkonzentration auf 100 µmol/l eingestellt, da in diesem Bereich die spezifische Bindung des Liganden an den Rezeptor maximal ist. Die unspezifische Bindung ist unabhängig von der Calcium-Konzentration, sie bleibt über den gesamten Konzentrationsbereich gleich.

Um die Calciumsensitivität des Ryanodinkanals zu quantifizieren bzw. um eventuelle Veränderungen der Calciumsensitivität zu messen, wird die Calciumkonzentration bei halbmaximaler Ryanidinbindung, der sogenannte  $EC_{50}$ - Wert bestimmt.

Die  $EC_{50}$ -Werte der während der Methodeninstallation durchgeführten Versuche zur Calciumabhängigkeit der Ryanidinbindung betragen  $0.32$  ( $0.31-0.35$ )  $\mu\text{M}$  (Angabe des 95% Konfidenzintervalles in Klammern).

### 3.2. Calciumabhängigkeit der Ryanodinbindung in ischämischem und reperfundierten Myokard

Wie weiter oben gezeigt, ist die Bindung des Ryanodin an den Calciumfreisetzungskanal abhängig von der Konzentration freier Calciumionen. Um zu untersuchen, ob Ischämie oder Reperfusion einen Einfluß auf den wichtigen physiologischen Parameter der Calciumsensitivität der Ryanodinbindung haben, wurden die Calciumsensitivitäten von ischämischem und reperfundierten rechtsatrialem Myokard jeweils in Doppelbestimmung miteinander verglichen.

#### 3.2.1 Calciumabhängigkeit der Ryanodinbindung: Ischämie versus Kontrolle

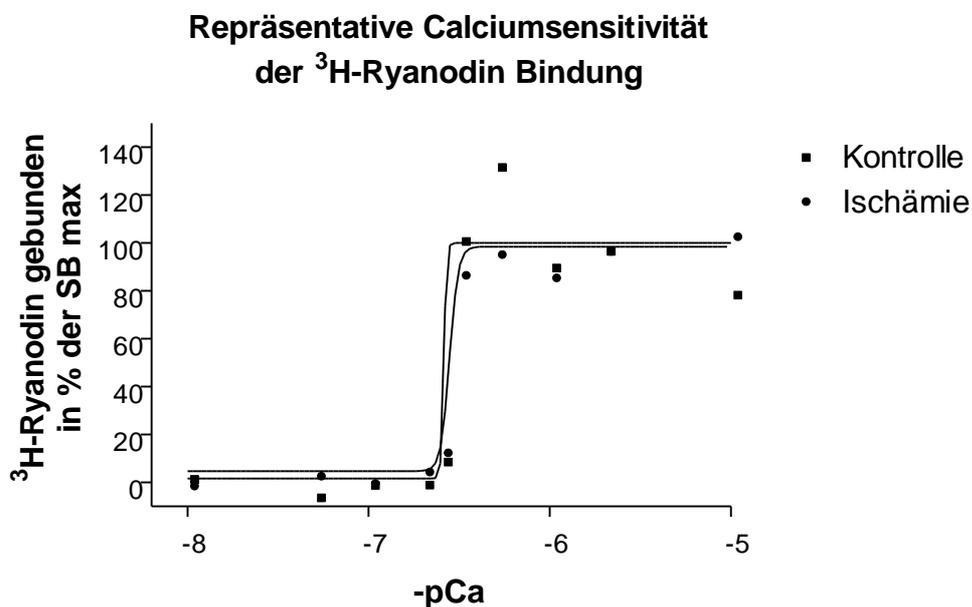


Abbildung 7 zeigt repräsentativ die Calciumabhängigkeit der Ryanodinbindung an den Calciumfreisetzungskanal am ischämischen Gewebe im Vergleich zur Kontrolle. Die Ryanodinbindung ist hier in Prozent der maximalen spezifischen Bindung gegen die freie Calciumionenkonzentration aufgetragen.

Die EC<sub>50</sub>-Werte für das ischämische Gewebe mit dem 95 % Konfidenzintervall betragen: 0.34 (0.32 - 0.39) µM und für das Kontrollgewebe 0.32 (0.31 - 0.35) µM.

Das Gewebe von 6 Patienten (Patienten Nr. 2, 3, 7, 8, 17 und 24) wurde jeweils in Doppelbestimmung untersucht.

Die Mittelwerte zwischen den einzelnen Versuchen wurden mit dem ungerichteten und unverbundenen t-Test verglichen. Eine Differenz zwischen zwei Werten mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0.05$  (5%) wurde als signifikant angesehen.

In der statistischen Analyse zeigte sich keine Signifikanz, so daß von einer unveränderten Calciumsensitivität des ischämischen Calciumfreisetzungskanals im bezug auf die Ryanodinbindung im Vergleich zum Kontrollgewebe ausgegangen werden kann.

### 3.2.2. Calciumabhängigkeit der Ryanodinbindung: Reperfusion versus Kontrolle

#### Repräsentative Calciumsensitivität der Ryanodinbindung

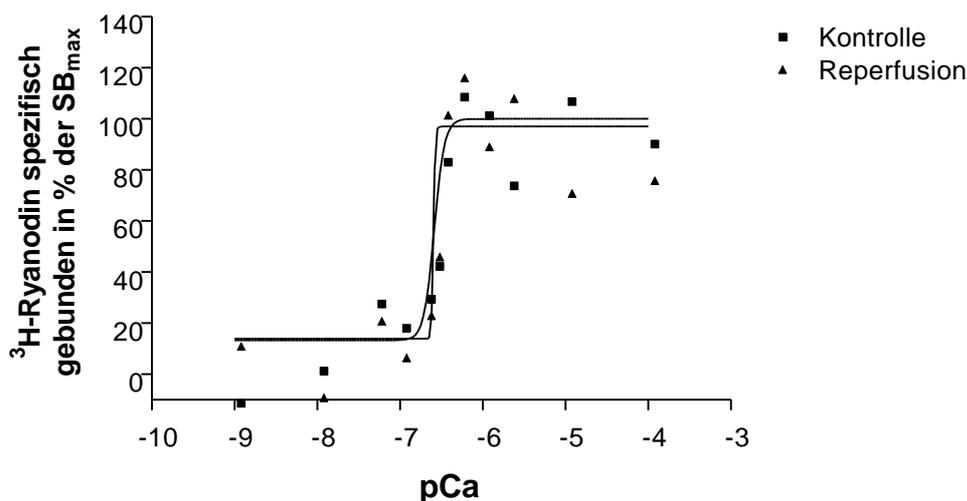


Abbildung 8 zeigt repräsentativ die Calciumabhängigkeit der Ryanodinbindung an den Calciumfreisetzungskanal am reperfundierten Gewebe im Vergleich zur Kontrolle. Die Ryanodinbindung ist hier in Prozent der maximalen spezifischen Bindung gegen die freie Calciumionenkonzentration aufgetragen.

Die EC<sub>50</sub>-Werte für das reperfundierte Gewebe mit dem 95 % Konfidenzintervall betragen 0.32 (0.30 - 0.35) µM und für die Kontrolle 0.37 (0.34 - 0.39) µM.

Es findet sich nach oben beschriebener statistischer Analyse kein signifikanter Unterschied zwischen den EC<sub>50</sub>-Werten des reperfundierten Gewebes im Vergleich zum Kontrollgewebe, so daß auch hier von einer unveränderten Calciumsensitivität der Ryanodinbindung an den Calciumfreisetzungskanal im Vergleich mit dem Kontrollgewebe ausgegangen werden kann.

### 3.3 Dichtebestimmung der Calciumfreisetzungskanäle in ischämischem und reperfundierten Myokard

#### 3.3.1 Dichtebestimmung der Calciumfreisetzungskanäle: Ischämie versus Kontrolle

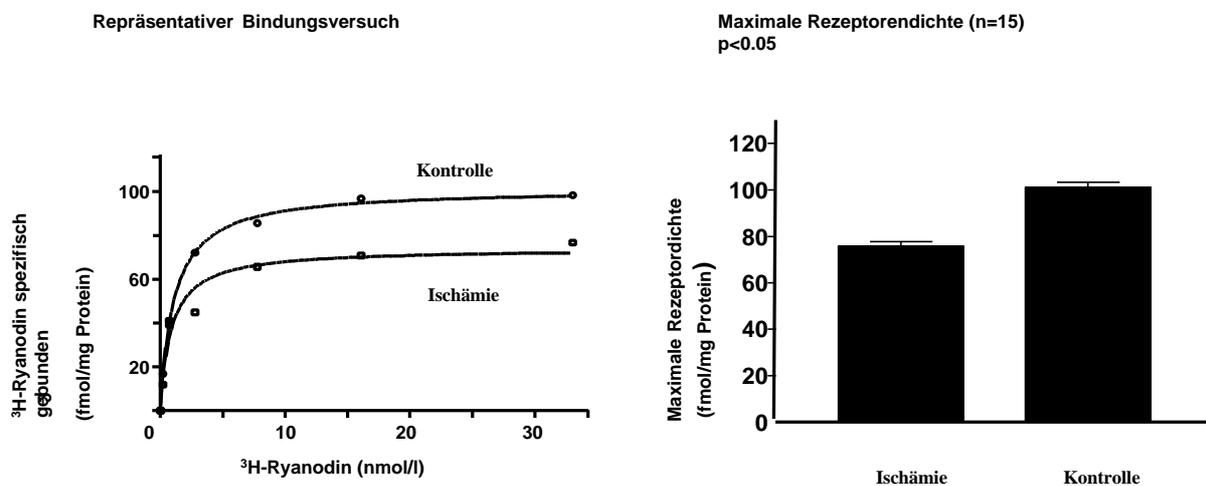


Abbildung 9 zeigt einen repräsentativen Ryanodinbindungsversuch an den Calciumfreisetzungskanal in ischämischem Myokard im Vergleich zu Kontrollgewebe. Die Abszisse zeigt die Konzentration des <sup>3</sup>H-Ryanodin in nmol/l, während die Ordinate das spezifisch gebundene <sup>3</sup>H-Ryanodin in fmol / mg Protein darstellt.

Die zweite Grafik zeigt die bei 15 Patienten gemessene maximale Rezeptordichte in ischämischem Myokard im Vergleich zu Kontrollgewebe; dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

Die maximale Rezeptorendichte ( $B_{\max}$ ) als Ausdruck der maximalen spezifischen Bindung war in ischämischem Myokard mit  $75.8 \pm 7.8$  fmol/mg Protein signifikant niedriger im Vergleich zu Kontrollgewebe ( $101.2 \pm 8.2$  fmol/mg Protein).

Die Radioligandenkonzentration bei halbmaximaler Bindung, der  $K_D$ -Wert (s.o.) als Maß für die Affinität des Liganden zum Rezeptor betrug in ischämischem Myokard ( $n = 15$ )  $1.201 \pm 0.116$  nmol/l und  $1.240 \pm 0.110$  nmol/l in Kontrollmyokard. Somit ergibt sich keine signifikante Änderung der Affinität des Liganden zum Rezeptor im Vergleich zwischen ischämischem und Kontrollmyokard.

Eine weitere Unteranalyse dieser Ergebnisse bezogen auf die kardiale Grunderkrankung ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

	<b><math>B_{\max}</math> Ischämie</b> <b>(fmol/mg Protein)</b>	<b><math>B_{\max}</math> Kontrolle</b> <b>(fmol/mg Protein)</b>
<b>Diagnose:</b>		
<b>KHK (n = 9)</b>	<b><math>75.38 \pm 6.11</math></b>	<b><math>102.59 \pm 8.49</math></b>
<b>AS (n = 1)</b>	<b>73.65</b>	<b>98.87</b>
<b>MS (n = 2)</b>	<b><math>76.13 \pm 2.47</math></b>	<b><math>100.71 \pm 9.58</math></b>
<b>AS + KHK (n = 4)</b>	<b><math>75.92 \pm 3.14</math></b>	<b><math>101.77 \pm 5.34</math></b>

Tabelle 3 zeigt eine genaue Aufschlüsselung der maximalen Rezeptorendichte in ischämischem und Kontrollmyokard bezogen auf die kardialen Grunderkrankungen der Patienten.

KHK: Koronare Herzerkrankung, AS: Aortenklappenstenose, MS: Mitralklappenstenose

Eine statistische Analyse der Daten ergibt keine signifikanten Unterschiede in der maximalen Rezeptordichte bezogen auf die kardiale Grunderkrankung.

Interaktionen der vorbestehenden Medikation mit den Calciumkanälen sind denkbar, da einige dieser Medikamente direkt oder indirekt in den Regulationskreislauf der Calciumhomöostase eingreifen:  $\beta$ -Rezeptorantagonisten, deren negativ inotrope Wirkung auch durch eine Regulation des Calciumeinflusses in die Zelle vermittelt wird, Digitalispräparate, die über ihre Wirkung an der Natrium/Kaliumpumpe den intracellulären Calciumgehalt erhöhen und auch Nitrate, die über die NO-vermittelte cardiodepressive Wirkung auch Einfluß auf die Calciumkanaldichte nehmen könnten.

Deshalb wurde wie in folgender Tabelle dargestellt, die Korrelation der Medikation mit der Rezeptordichte untersucht.

	<b>B<sub>max</sub> Ischämie</b> <b>(fmol/mg Protein)</b>	<b>B<sub>max</sub> Kontrolle</b> <b>(fmol/mg Protein)</b>
<b>Medikation:</b>		
<b>b-Blocker ( n = 9)</b>	<b>75.43 ± 534</b>	<b>102.45 ± 7.83</b>
<b>ACE-Hemmer (n = 6)</b>	<b>72.14 ± 5.94</b>	<b>101.68 ± 6.42</b>
<b>Nitrate (n = 9)</b>	<b>75.72 ± 3.67</b>	<b>101.98 ± 8.73</b>
<b>Digitalis (n = 4)</b>	<b>77.38 ± 2.73</b>	<b>100.17 ± 6.48</b>
<b>Molsidomin (n = 3)</b>	<b>76.04 ± 4.52</b>	<b>102.45 ± 4.78</b>

Tabelle 3 zeigt eine weitere Aufschlüsselung der gemessenen maximalen Rezeptordichte in ischämischem Vorhofmyokard im Vergleich zu Kontrollgewebe bezüglich der präoperativen medikamentösen Therapie.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der maximalen Rezeptordichte im Vergleich zur Gesamtanalyse.

### 3.3.2 Dichtebestimmung der Calciumfreisetzungskanäle: Reperfusion versus Kontrolle

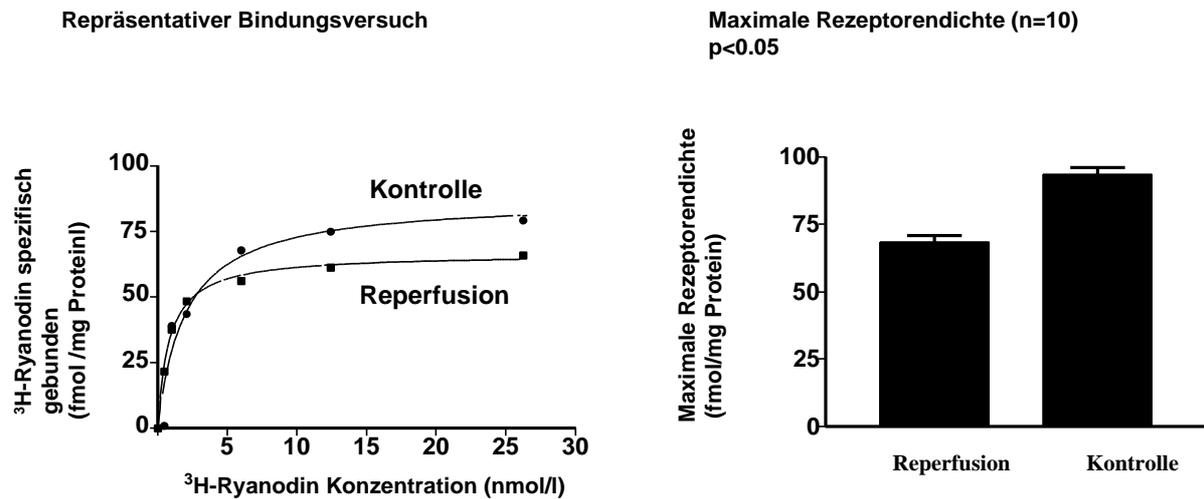


Abbildung 10 zeigt einen repräsentativen Ryanodinbindungsversuch an den Calciumfreisetzungskanal in reperfundiertem Myokard im Vergleich zu Kontrollmyokard. Die Abszisse zeigt die steigende  $^3\text{H}$ -Ryanodinkonzentration, während die Ordinate das spezifisch gebundene  $^3\text{H}$ -Ryanodin in fmol/mg Protein darstellt.

Die zweite Grafik zeigt die bei 15 Patienten gemessene maximale Rezeptordichte in reperfundiertem Myokard im Vergleich zu Kontrollgewebe; dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Die maximale Rezeptordichte ( $B_{\text{max}}$ ) als Ausdruck der maximalen spezifischen Bindung betrug in reperfundiertem Myokard  $68.4 \pm 7.6$  fmol/mg Protein und  $93.5 \pm 8.1$  fmol/mg Protein im Kontrollgewebe (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung).

Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Reduktion der Dichte der Calciumfreisetzungskanäle in reperfundiertem im Vergleich zu Kontrollmyokard ( $p < 0.05$ ).

Die Radioligandenkonzentration bei halbmaximaler Bindung, der  $k_D$ -Wert (s.o.) als Maß für die Affinität des Liganden zum Rezeptor betrug in reperfundiertem Myokard ( $n = 10$ )  $1.182 \pm 0.112$  nmol/l und  $1.114 \pm 0.118$  nmol/l in Kontrollmyokard. Somit ergibt sich keine signifikante Änderung der Affinität des Liganden zum Rezeptor im Vergleich zwischen reperfundiertem und Kontrollmyokard.

Eine weitere Unteranalyse dieser Ergebnisse bezogen auf die kardiale Grunderkrankung ist in Tabelle 4 dargestellt:

	<b>B<sub>max</sub> Reperfusion</b> (fmol/mg Protein)	<b>B<sub>max</sub> Kontrolle</b> (fmol/mg Protein)
<b>Diagnose:</b>		
<b>KHK ( n = 4)</b>	<b>68.92 ± 3.78</b>	<b>93.81 ± 5.67</b>
<b>AS (n = 1)</b>	<b>65.62</b>	<b>94.42</b>
<b>MS (n = 1)</b>	<b>70.98</b>	<b>90.75</b>
<b>AS + KHK (n = 4)</b>	<b>69.11 ± 3.24</b>	<b>93.97 ± 7.24</b>

Tabelle 4 zeigt den Vergleich der maximalen Rezeptordichte in reperfundiertem und Kontrollmyokard bezogen auf die kardiale Grunderkrankung der Patienten. KHK: Koronare Herzerkrankung, AS: Aortenklappenstenose, MS: Mitralklappenstenose.

Auch in reperfundiertem Myokard läßt sich kein signifikanter Unterschied in der maximalen Rezeptordichte des Calciumfreisetzungskanals innerhalb der beiden Gruppen Reperfusion und Kontrolle bezogen auf die kardiale Grunderkrankung bzw. die Art der Herzoperation zeigen.

Auch eine für das reperfundierte Gewebe Analyse bezüglich der vorbestehenden Medikation und möglicher Interaktionen bezüglich der Dichte des Calciumfreisetzungskanals wurde durchgeführt.

	<b>B<sub>max</sub> Reperfusion</b> <b>(fmol/mg Protein)</b>	<b>B<sub>max</sub> Kontrolle</b> <b>(fmol/mg Protein)</b>
<b>Medikation:</b>		
<b>b-Blocker ( n = 6)</b>	<b>68.55 ± 5.73</b>	<b>93.84 ± 4.34</b>
<b>ACE-Hemmer (n = 5)</b>	<b>66.13 ± 6.04</b>	<b>94.17 ± 5.68</b>
<b>Nitrate (n = 2)</b>	<b>69.90 ± 4.28</b>	<b>91.92 ± 3.25</b>
<b>Digitalis (n = 0)</b>		
<b>Molsidomin (n = 6)</b>	<b>69.07 ± 5.12</b>	<b>92.89 ± 5.73</b>

Tabelle 5 zeigt die weitere Aufschlüsselung der maximalen Rezeptordichte des Calciumfreisetzungskanals in reperfundierte Vorhofmyokard versus Kontrollgewebe bezogen auf die präoperative medikamentöse Therapie der Patienten.

Diese zeigte keine signifikanten Unterschiede der maximalen Rezeptordichte bezogen auf die präoperativ bestehende Medikation im Vergleich zur Gesamtanalyse.

### 3.4 Festlegung der Versuchsbedingungen in den Radioligandenbindungsexperimenten am L-Typ Calciumkanal

#### 3.4.1 Assoziation des Rezeptor-Ligandenkomplexes

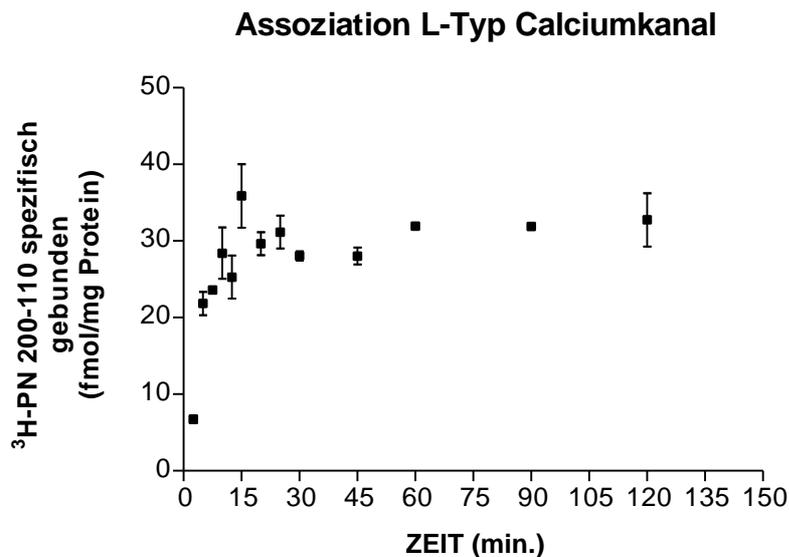


Abbildung 11 beschreibt die Abhängigkeit der spezifischen Bindung von <sup>3</sup>H-Ryanodin an Homogenaten von der Inkubationszeit. Bei Inkubationszeiten kürzer als 30 min wurde das Equilibrium noch nicht erreicht. Die spezifische Bindung stieg bis zu einer Inkubationszeit von 15 min steil an. Von 30 min bis 120 min Inkubationszeit blieb die spezifische Bindung konstant, das Equilibrium war erreicht.

Die folgenden Bindungsexperimente wurden mit einer Inkubationsdauer von 60 min durchgeführt.

### 3.4.2 Proteinabhängigkeit der Rezeptordichte

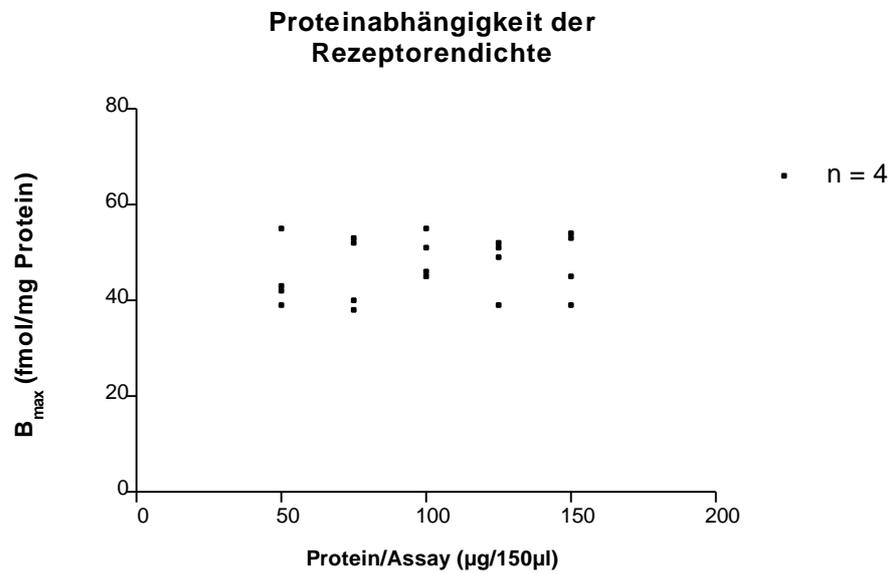


Abbildung 12 analysiert die Variation des Proteineinsatzes pro Bindungsassay. Die Messung erfolgte in Vierfachbestimmung, und zeigt den nur geringen Einfluß der Proteinkonzentration im Bindungsansatz auf die maximale Rezeptordichte im Bereich zwischen 50-150 µg Protein/ Assay

In den Routineexperimenten wurde daher die Proteinkonzentration auf 100 µg/ Assay eingestellt.

### 3.4.3 Verdrängung des $^3\text{H}$ -PN 200-110 mit steigender Konzentration an Nifedipin

Die Aufnahme einer Verdrängungskurve diente der Ermittlung der Nifedipinkonzentration, bei der das  $^3\text{H}$ -PN 200-110 vollständig aus seiner Bindungsstellen am 1.4 Dihydropyridin Rezeptor verdrängt ist. Dies dient zur Ermittlung der unspezifischen Bindung.

In Abbildung 20 ist die spezifische Bindung von  $^3\text{H}$ -PN 200-110 an Homogenaten von humanem rechtsatrialen Gewebe in Prozent der maximalen spezifischen Bindung über der Konzentration des Verdrängers aufgetragen. Der sigmoide Kurvenverlauf der Kurve für Nifedipin zeigt, daß steigende Konzentrationen von Nifedipin den Radioliganden mehr und mehr von den Rezeptoren verdrängten. Bei Konzentrationen oberhalb von  $10^{-5}$  mol/l fand keine wesentliche Verminderung der Bindung mehr statt. Diese Konzentration war also geeignet, den Radioliganden nahezu vollständig vom Rezeptor zu verdrängen. Die Bindung bei  $10^{-5}$  mol/l Nifedipin wurde daher als unspezifische Bindung definiert.

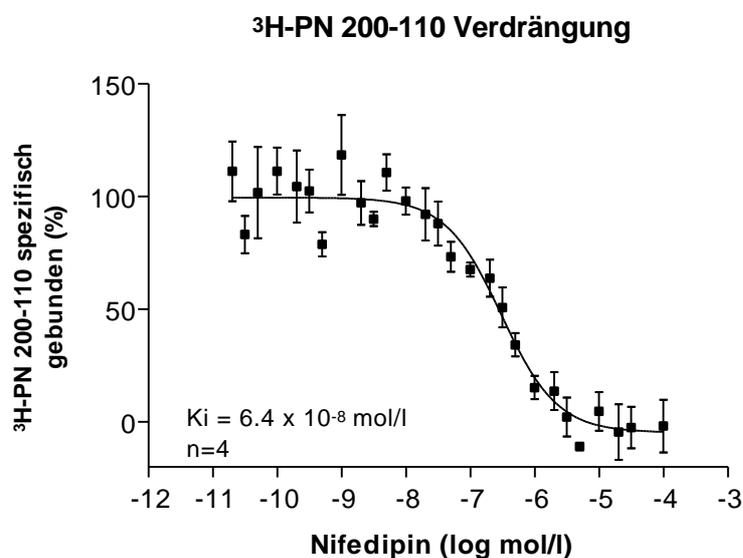


Abbildung 13 zeigt die Verdrängung von  $^3\text{H}$ -PN 200-110 durch den Antagonisten am 1.4 Dihydropyridinrezeptor Nifedipin.

Ordinate: spezifische Bindung von  $^3\text{H}$ -PN 200-110 in % der ohne Verdränger gemessenen Bindung. Abszisse: Konzentration des Verdrängers in mol/l. Durch nichtlineare Regression wurden je die  $\text{IC}_{50}$ -Werte für die Verdrängung des Radioliganden ermittelt.

Aus der sigmoidalen Verdrängungskurve läßt sich mit Hilfe des  $IC_{50}$ -Wertes und der Umwandlung nach Cheng-Prusoff der  $K_i$ -Wert errechnen.

Der  $K_i$ -Wert ist ein Maß für die Affinität des Verdrängers zum Rezeptor:

$$K_i = IC_{50} / (1 + L / K_D)$$

Diese Umformung gilt nur für kompetitive Hemmtypen (Cheng und Prusoff, 1973)

Bei Bestimmung der Affinitäten wurden kleine Ligandenkonzentrationen eingesetzt, die etwa im Bereich des  $K_D$ -Wertes lagen. Angegeben wurde hier im Falle einer kompetitiven Hemmung der  $K_i$ -Wert und zum Vergleich der  $IC_{50}$ -Wert.

Um mehrere Versuche zusammen statistisch auswerten zu können, wurde die  $SB_t$  in Prozent der maximalen spezifischen Bindung gegen die Verdrägerkonzentration aufgetragen. Hierzu wurde in einem separaten Ansatz eine TB und eine UB bestimmt.

Zur Auswertung wurde von den Counts des jeweiligen Ansatzes ( $B_t$ ) die UB subtrahiert, durch die maximale spezifische Bindung dividiert und mit 100 multipliziert.

$$SB_t = (B_t - UB) / SB \times 100 (\&)$$

Der  $K_i$ -Wert für Nifedipin am 1.4 - Dihydropyridinrezeptor des L-Typ Calciumkanals in humanem rechtsatrialen Myokard beträgt  $6.4 \times 10^{-3}$  mol/l (n = 4).

Bei einer Nifedipin Konzentration von  $10^{-5}$  mol/l zeigte sich anhand der Verdrängungskurve, daß alle Rezeptoren vom Verdränger quantitativ geblockt waren.

In allen Routineversuchen wurde diese Konzentration zur Bestimmung der UB eingesetzt.

### 3.5 Dichtebestimmung der L-Typ-Calciumkanäle in ischämischem und reperfundierten Myokard

#### 3.5.1 Dichtebestimmung der L-Typ Calciumkanäle: Ischämie versus Kontrolle

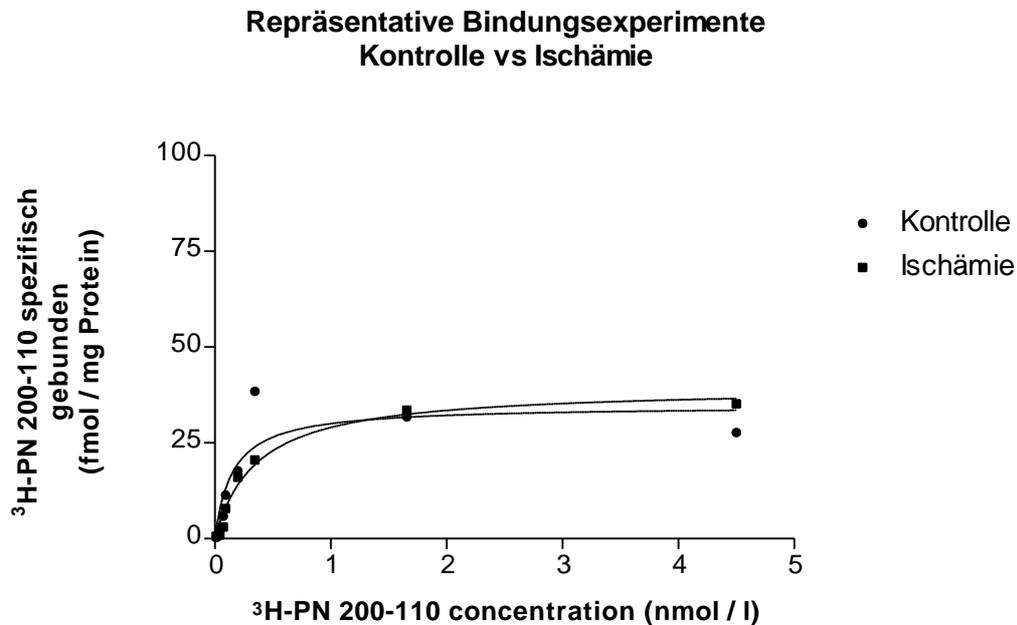


Abbildung 14 beschreibt jeweils eine SB von  $^3\text{H-PN 200-110}$  an ischämischem- und Kontrollmyokard. Die Abszisse zeigt die steigende  $^3\text{H-PN 200-110}$  Konzentration (nmol/l) und die Ordinate das spezifisch gebundene  $^3\text{H-PN 200-110}$  (fmol/mg Protein)

	<b><math>B_{\max}</math> (fmol/mg Protein)</b>	<b><math>K_d</math>(nmol/l)</b>
<b>Ischämie (n = 12):</b>	<b><math>53.51 \pm 6.69</math></b>	<b><math>1.67 \pm 0.24</math></b>
<b>Kontrolle (n = 13):</b>	<b><math>58.58 \pm 6.49</math></b>	<b><math>1.32 \pm 0.21</math></b>

Tabelle 6 zeigt die maximale Rezeptordichte und den  $K_D$ -Wert, als Maß für die Affinität des Liganden zum Rezeptor, in ischämischem rechtsatrialen Vorhofmyokard im Vergleich zu Kontrollmyokard.

Die maximale Rezeptordichte des L-Typ Calciumkanals in ischämischem rechtsatrialen, humanen Myokard ist gegenüber dem nicht ischämischen Kontrollgewebe nicht statistisch signifikant verändert bei ebenfalls unveränderter Affinität des Liganden zum Rezeptor ( $p < 0.05$ ).

Eine weitere Unteranalyse der maximalen Rezeptordichte bezogen auf die jeweilige kardiale Grunderkrankung bzw. die Operationsindikation der Patienten (KHK, AS oder MS) ergab ebenfalls keine statistisch signifikanten Veränderungen.

	<b>B<sub>max</sub> Ischämie</b> (fmol/mg Protein)	<b>B<sub>max</sub> Kontrolle</b> (fmol/mg Protein)
<b>Diagnose:</b>		
<b>KHK ( n = 7)</b>	<b>52.74 ± 3.45</b>	<b>58.59 ± 6.43</b>
<b>AS (n = 1)</b>	<b>54.54</b>	<b>55.85</b>
<b>MS (n = 3)</b>	<b>51.51 ± 2.63</b>	<b>58.78 ± 4.31</b>
<b>AS + KHK (n = 4)</b>	<b>50.1 ± 3.24</b>	<b>60.47 ± 3.24</b>

Tabelle 7 beschreibt den Vergleich der maximalen Rezeptordichte des L-Typ Calciumkanals in ischämischem Vorhofmyokard im Vergleich zu Kontrollmyokard bezogen auf die kardiale Grunderkrankung der Patienten.

Auch bei der Untersuchung des L-Typ Calciumkanals interessierte eine mögliche Interaktion der Calciumkanäle mit der vorbestehenden Medikation des Patienten.

	<b>B<sub>max</sub> Ischämie</b> <b>(fmol/mg Protein)</b>	<b>B<sub>max</sub> Kontrolle</b> <b>(fmol/mg Protein)</b>
<b>Medikation:</b>		
<b>b-Blocker ( n = 9)</b>	<b>53.67 ± 3.53</b>	<b>58.12 ± 6.73</b>
<b>ACE-Hemmer (n = 6)</b>	<b>51.84 ± 4.38</b>	<b>59.97 ± 5.52</b>
<b>Nitrate (n = 9)</b>	<b>52.98 ± 6.36</b>	<b>58.04 ± 7.16</b>
<b>Digitalis (n = 4)</b>	<b>52.56 ± 4.71</b>	<b>59.74 ± 4.68</b>
<b>Molsidomin (n = 3)</b>	<b>53.07 ± 3.16</b>	<b>57.89 ± 4.36</b>

Tabelle 8 beschreibt eine Aufschlüsselung der maximalen Rezeptordichte des L-Typ Calciumkanals in ischämischem Vorhofmyokard im Vergleich zu Kontrollgewebe bezogen auf die präoperative Medikation der Patienten

In einer weiteren Aufschlüsselung der maximalen Rezeptordichte des L-Typ Calciumkanals bezogen auf die präoperative Medikation der Patienten bestanden keine signifikanten Unterschiede ( $p < 0.05$ ).

### 3.5.2 Dichtebestimmung der L-Typ Calciumkanäle: Reperfusion versus Kontrolle

Die maximale Rezeptordichte des L-Typ Calciumkanales in reperfundiertem rechtsatrialen Myokard ist gegenüber dem Kontrollgewebe nicht statistisch signifikant verändert, wie Abbildung 15 belegt, bei ebenfalls unveränderter Affinität des Liganden zum Rezeptor ( $p < 0.05$ ).

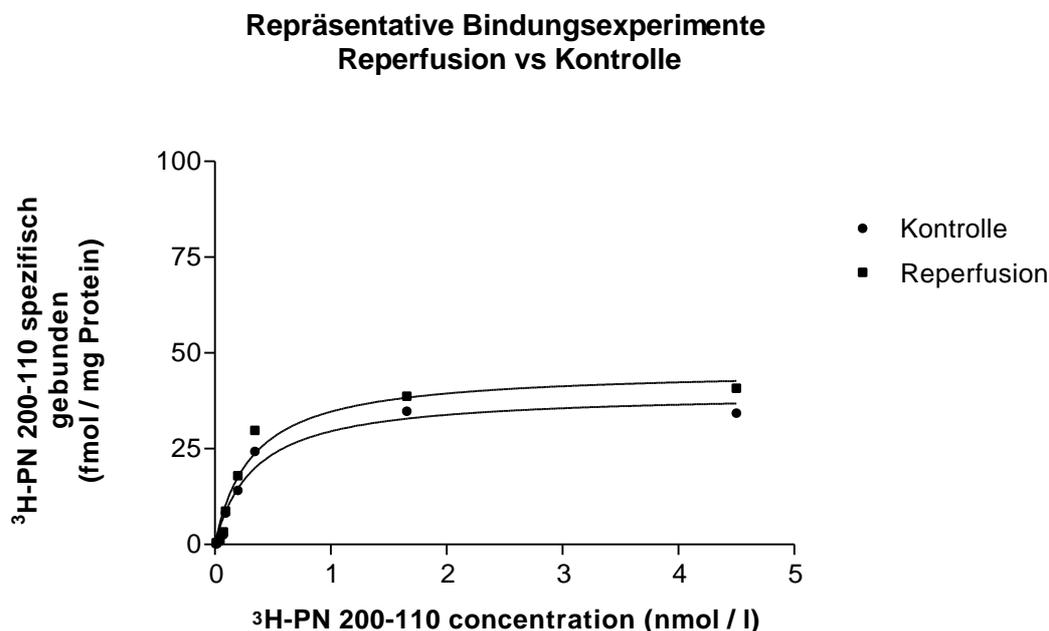


Abbildung 15 zeigt jeweils eine SB von  $^3\text{H-PN 200-110}$  an ischämischem und Kontrollmyokard. Die Abszisse zeigt die steigende  $^3\text{H-PN 200-110}$  Konzentration (nmol/l) und die Ordinate das spezifisch gebundene  $^3\text{H-PN 200-110}$  (fmol/mg Protein)

	<b><math>B_{\max}</math> (fmol/mg Protein)</b>	<b><math>K_D</math>(nmol/l)</b>
<b>Reperfusion (n = 10):</b>	<b><math>51.43 \pm 4.05</math></b>	<b><math>1.32 \pm 0.204</math></b>
<b>Kontrolle (n = 10):</b>	<b><math>48.43 \pm 8.17</math></b>	<b><math>1.32 \pm 0.239</math></b>

Tabelle 4 zeigt die maximale Rezeptordichte und den  $K_D$ -Wert, als Maß für die Affinität des Liganden zum Rezeptor, in reperfundiertem Myokard im Vergleich zu Kontrollmyokard.

KHK: Koronare Herzerkrankung, AS: Aortenklappenstenose, MS: Mitralklappenstenose

Auch in reperfundiertem Myokard läßt sich kein signifikanter Unterschied in der maximalen Rezeptordichte des Calciumfreisetzungskanals innerhalb der beiden Gruppen Reperfusion und Kontrolle bezogen auf die kardiale Grunderkrankung bzw. die Art der Herzoperation zeigen.

	<b>B<sub>max</sub> Reperfusion</b> <b>(fmol/mg Protein)</b>	<b>B<sub>max</sub> Kontrolle</b> <b>(fmol/mg Protein)</b>
<b>Diagnose:</b>		
<b>KHK ( n = 4)</b>	<b>50.32 ± 1.62</b>	<b>47.11 ± 4.54</b>
<b>AS (n = 1)</b>	<b>49.81</b>	<b>49.71</b>
<b>MS (n = 1)</b>	<b>53.43</b>	<b>50.12</b>
<b>AS + KHK (n = 4)</b>	<b>51.58 ± 2.84</b>	<b>48.97 ± 3.44</b>

Tabelle 9 zeigt den Vergleich der maximalen Rezeptordichte in reperfundiertem und Kontrollmyokard bezogen auf die kardiale Grunderkrankung der Patienten.

KHK: Koronare Herzerkrankung, AS: Aortenklappenstenose, MS: Mitralklappenstenose

Auch die Subanalyse bezüglich der Medikation ergibt keinen signifikanten Unterschied in der maximalen Rezeptordichte in reperfundiertem Vorhofmyokard im Vergleich zu Kontrollgewebe.

	<b>B<sub>max</sub> Reperfusion</b> <b>(fmol/mg Protein)</b>	<b>B<sub>max</sub> Kontrolle</b> <b>(fmol/mg Protein)</b>
<b>Medikation:</b>		
<b>b-Blocker ( n = 6)</b>	<b>48.47 ± 4.93</b>	<b>47.94 ± 5.61</b>
<b>ACE-Hemmer (n = 5)</b>	<b>50.75 ± 4.87</b>	<b>48.49 ± 4.11</b>
<b>Nitrate (n = 2)</b>	<b>52.33 ± 4.46</b>	<b>50.12 ± 2.85</b>
<b>Digitalis (n = 0)</b>		
<b>Molsidomin (n = 6)</b>	<b>51.67 ± 3.28</b>	<b>49.39 ± 4.96</b>

Tabelle 10 analysiert die maximale Rezeptordichte in reperfundiertem Vorhofmyokard im Vergleich zu Kontrollgewebe bezogen auf die Medikation der Patienten . Da die meisten Patienten unter Mehrfachmedikation standen, ist n > 10.

#### 4. Diskussion

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit der Frage, ob die sowohl an menschlichem Gewebe wie auch im Tiermodell in der Literatur beschriebene Veränderung der intracellulären Calciumhomöostase während Ischämie und anschließender Reperfusion Einfluß auf die Dichte und Offenwahrscheinlichkeit (open probability) der humanen myokardialen Calciumkanäle hat; hier untersucht am Ryanodin-sensitiven Calciumfreisetzungskanal des Sarkoplasmatischen Retikulums und am spannungsabhängigen L Typ Calciumkanal in rechtsatrialem, humanen Myokard

Es wurde in dieser Studie das Augenmerk auf die Calciumkanäle gerichtet, da diese eine Schlüsselfunktion im intracellulären Calciumcycling besitzen, da sie, im Falle des L-Typ Calciumkanals, den Calciumeinstrom in die Zelle regulieren und im Falle des Calciumfreisetzungskanals für die intracelluläre Bereitstellung des Calciums zur Kontraktion sorgen.

An porcinem Myokard konnte gezeigt werden (Valdivia und Mentzer, 1997), daß bereits nach 10 minütiger vollständiger LAD-Okkludierung mit nachfolgender 2 stündiger Reperfusion eine signifikante Dichtereduzierung der Ryanodin-sensitiven Calciumfreisetzungskanäle bestand. An Hundemyokard wurde ebenfalls eine 20%ige Dichtereduzierung der Ryanodin-sensitiven Calciumfreisetzungskanäle nach 15 minütiger Ischämie, allerdings ohne anschließende Reperfusion (Darling und Meissner, 1992), gezeigt. An Rattenmyokard wurde eine Reduzierung der maximalen Rezeptordichte des Ryanodin-sensitiven Calciumfreisetzungskanals um 40 % nach 20 minütiger Ischämie beschrieben, die auch nach Reperfusion persistierte (Zuchi und Mariani, 1994).

Somit spricht eine Fülle von Daten aus dem tierexperimentellen Bereich für eine Reduzierung der Dichte des Calciumfreisetzungskanals und somit auch für eine Aktivitätsminderung des Kanals, da die Bindung des Alkaloids Ryanodin an den Calciumfreisetzungskanal nur erfolgt, wenn der Kanal selbst aktivierbar ist.

An menschlichem Myokard wurde bis jetzt nur die  $Ca^{2+}$ -Aufnahme in das Sarkoplasmatische Retikulum untersucht (Zuchi und Barsotti, 1996). Diese Autoren konnten in einem kardiochirurgischen Modell zeigen, daß eine Verminderung der Calcium Aufnahme in das Sarkoplasmatische Retikulum in rechtsatrialem, humanem Myokard durch die SR  $Ca^{2+}$ -ATPase bestand.

In unserer Studie konnte an einem ähnlichen kardiochirurgischem Modell einer reversiblen myokardialen Ischämie, denn es gab bei keinem der hier untersuchten Patienten einen Anhalt für eine postoperativ weiterbestehende Ischämie, eine Dichtereduzierung des Calciumfreisetzungskanals um 25 % sowohl während der Ischämie als auch nach 30 minütiger Reperfusion gezeigt werden.

Gleichzeitig wurde auch in dieser Studie keine Änderung der  $K_D$ -Werte zwischen Kontrollgewebe, d.h. vor Ischämie, ischämischem Gewebe und reperfundiertem Gewebe festgestellt, so daß nicht von einer Änderung der Rezeptordichte aufgrund einer ischämiebedingten Affinitätsänderung zwischen Ligand und Rezeptor ausgegangen werden kann. Diese Daten stehen im Einklang mit tierexperimentellen Befunden, in denen auch keine Änderungen der  $K_D$ -Werte beschrieben wurden.

Ebenso konnte keine Änderung der Calciumsensitivität der Ryanodinbindung an den Calciumfreisetzungskanal während Ischämie und Reperfusion im Vergleich zu Kontrollgewebe dokumentiert werden.

Es muß jedoch ganz klar auf die Limitationen der vorliegenden Studie hingewiesen werden. Zuerst wurde im Gegensatz zu allen tierexperimentell erhobenen Daten kein Ventrikelmuskulatur sondern Gewebe aus dem rechten Atrium und dem rechten Aurikulum verwendet, so daß sich diese Ergebnisse sicherlich nicht ohne weiteres auf humanes linksventrikuläres Arbeitsmyokard übertragen lassen.

Desweiteren handelt es sich bei dem ischämischen Gewebe um cardioplegisches Myokard. Die Prinzipien der cardioplegischen Protektion nach Hearse (1983) bestehen in einer Energiekonservierung durch schnellen und kompletten diastolischen Arrest und Hypothermie sowie Vermeidung weiterer Ischämie induzierter Schädigung des Myokards durch variable Zusätze.

Die in dieser Untersuchung verwendete Bretschneider-Cardioplegie gehört zu den intrazellulären Cardioplegie-Lösungen. Diese sind an intrazelluläre Elektrolytkonstellationen angelehnt und bestehen in der Haupttasche aus Kalium und wenig Natrium. Zusätze von Calciumionen fehlen ganz. Es wird postuliert, daß einer der protektiven Effekte auf der Calciumfreiheit der Lösung und somit auf einer Vermeidung der vorab beschriebenen Calciumüberladung (calcium overload) der Zelle besteht (Hearse, 1983).

Somit muß man berücksichtigen, daß die Dichtereduzierung der Calciumfreisetzungskanäle auch durch die Verwendung der Cardioplegie beeinflusst sein kann, da ein nicht

physiologisches Calciummilieu möglicher Weise zu einer Schädigung des Kanals oder aber zu einer Up -bzw. Downregulierung des Kanals führen könnte.

In diesem Zusammenhang muß auch auf das Phänomen des „preconditioning“ eingegangen werden. Ischämisches Preconditioning bedeutet, daß durch eine kurze Ischämiezeit gefolgt von einer kurzen Reperfusion des Myokards letzteres resistent wird gegen Verletzungen durch weitere längere Episoden von Ischämie (Yellon und Pugsley, 1993).

Das preconditioning – Modell dieser Autoren bestand in 2 Episoden von jeweils 2 minütigem aortalem cross-clamping gefolgt von 3 minütiger Reperfusion im Rahmen einer aortokoronaren Bypassoperation vor Einleitung der eigentlichen Ischämie. Es erfolgte eine dreimalige Probenentnahme aus dem Myokard der linken Vorderwand. Yellon und Pugsley konnten in diesem Gewebe zeigen, daß die ATP-Konzentrationen in allen Biopsien der „präkonditionierten“ Herzen signifikant höher waren als im nicht präkonditionierten Gewebe, was für eine Energiekonservierung in diesem Gewebe spricht.

Vor dem Hintergrund des Effekts der Cardioplegie, des Phänomens des Preconditioning sowie der Hypothermie gibt es in diesem hier verwandten Modell über die Ischämie hinaus möglichen Einfluß auf die Dichte der Calciumfreisetzungskanäle.

Mit der Methode der Radioligandenbindung kann nicht geklärt werden, ob es sich bei der signifikanten Reduzierung der Rezeptordichte um 25 % lediglich um eine Downregulierung der Kanäle, eventuell mitinduziert durch Cardioplegie oder um eine wirkliche Denaturierung durch ischämische Verletzung der Kanäle handelt, da diese Methode nichts über die physiologische Funktion des Kanals aussagt. Die Bindung läßt nur die Aussage zu, daß die Konformation des Kanals soweit gewahrt ist, daß eine Aktivierbarkeit des Kanals möglich ist. Ob die Funktion reduziert oder gesteigert ist, läßt sich durch die Methode der Radioligandenbindung nicht feststellen.

Eine mögliche Einflußnahme der kardialen Grunderkrankung auf die Rezeptordichte läßt sich vermuten, wenn man die unterschiedliche Pathophysiologie valvulärer Herzerkrankungen mit denen der koronaren Herzerkrankung vergleicht. So könnte man bei der valvulären Erkrankungen zugrundeliegenden Volumen und Druckbelastung einen Unterschied zur vornehmlich ischämischen Schädigung durch eine schwere koronare Herzerkrankung mit Indikation zur operativen Revaskularisierung vermuten. In der Literatur gibt es bis jetzt keine

Beschreibung eines solchen durch das zugrundeliegende kardiale Krankheitsbild verursachten Schädigung der Calciumknäle.

In der durchgeführten Analyse der einzelnen Rezeptordichten auf die Patientensubgruppen konnten keine Unterschiede bezüglich der kardialen Grunderkrankung (Koronare Herzerkrankung, Aortenklappenstenose, Mitralklappenstenose) festgestellt werden, so daß es in der vorliegenden Studie keinen Anhalt für einen Einfluß der kardialen Grunderkrankung auf das Rezeptorverhalten gibt. Hierbei muß sicherlich die geringe Patientenzahl ( $n = 25$ ) berücksichtigt werden muß.

Eine weitere wichtige Frage war der die Untersuchung der Rezeptordichte in bezug auf die vorbestehende Medikation, da insbesondere eine Einwirkung von positiv inotropen bzw. negativ inotropen Substanzen auf das Verhalten der Calciumfreisetzungskanäle denkbar ist. Es ließen sich in den einzelnen Untergruppen keine Unterschiede in der maximalen Rezeptordichte während Ischämie und Reperfusion bezogen auf die vorbestehende Medikation, insbesondere auch mit Digitalispräparaten und  $\beta$ -Rezeptorantagonisten, feststellen.

Tierexperimentelle Daten (Rattenmyokard) bezüglich der maximalen Rezeptordichte des spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanals in ischämischem Myokard beschreiben sowohl eine Downregulation (van Amsterdam und Zaagsma 1990; Nayler und McKelvie 1985) als auch eine unveränderte Kanaldichte in ischämischem Rattenmyokard (Zucchi und Mariani 1995)

Die Radioligandenbindungsversuche am L-Typ Calciumkanal erfolgen mit unterschiedlichen Antagonisten am 1.4 Dihydropyridin-Rezeptor an der  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit des Rezeptors, die auch die Kanal-formende Untereinheit ist.

Diese divergierenden Aussagen können bedingt sein durch unterschiedliche Tiermodelle sowie Unterschiede in der Wahl des Radioliganden als auch des Assays.

Die positiv inotrope Modulierung des L-Typ Calciumkanals erfolgt über eine Protein – Kinase A medierte Serin/Threonin - Phosphorylierung der  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit des Dihydropyridinrezeptors über den cAMP pathway (Bünnemann und Hosey, 1999).

Welling und Kass (1993) konnten zeigen, daß die Affinität der Calciumkanalblocker vom Dihydropyridintyp zur Bindungsstelle an der  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit mit steigender Membrandepolarisierung zunimmt. Es gibt somit Hinweise dafür, daß Calciumkanalblocker mit hoher Affinität an den inaktivierten Kanal binden.

Die Calcium abhängige Inaktivierung der L-Typ Kanäle ist ein weiterer wichtiger Regulationsmechanismus: Calciumionen binden direkt an die  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit der Kanäle (Zühlke und Reuter, 1998).

Es ist somit evident, daß bedeutende Regulationsmechanismen zur Modulierung der Aktivität des L-Typ Calciumkanals an der  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit des Kanals ansetzen, welche auch gleichzeitig die Bindungsstelle für die in dieser Studie benutzten Radioliganden darstellt und damit die Möglichkeit der Veränderung der Bindungseigenschaften des Radioliganden durchaus gegeben sind.

In der vorliegenden Studie wurde keine signifikante Veränderung der Dichte des L-Typ-Calciumkanals in ischämischem und reperfundierten Vorhofmyokard im Vergleich zu Kontrollgewebe aus Vorhofmyokard gefunden. Die Radioligandenbindung an den L-Typ-Calciumkanal sagt im Gegensatz zur Ryanodinbindung an den Calciumfreisetzungskanal nichts aus über die Aktivierbarkeit des Kanals. Die Calciumkanalantagonisten binden unabhängig von der Aktivierbarkeit des Kanals, jedoch wie oben beschrieben ist die Affinität der Liganden zum inaktivierten Kanal höher.

Da in der vorliegenden Studie die  $K_D$ -Werte genauso wie die maximale Rezeptordichte in ischämischem und reperfundiertem Gewebe im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert waren, kann davon ausgegangen werden, daß sich die Affinität des Liganden zum Rezeptor während der unterschiedlichen Meßzeitpunkte nicht verändert hat.

Untersucht man die Rezeptordichte und die Affinität bezüglich der kardialen Grunderkrankungen und vor allem auch bezüglich der vorbestehenden Medikation (Patienten, die mit einem Calciumkanalblocker vorbehandelt waren, wurden nicht in die Studie eingeschlossen), zeigten sich auch beim L-Typ Calciumkanal keine Unterschiede im Vergleich zur Gesamtanalyse.

Insbesondere zeigten sich auch keine Unterschiede zwischen Patienten ohne Vormedikation und Patienten unter 3- und 4-fach Medikation.

Somit zeigt sich unter kardiochirurgischer Ischämie und anschließender 30 minütiger Reperfusion eine gleichbleibende Dichte der sarkolemmalen L-Typ Calciumkanäle in Vorhofmyokard bei unveränderter Rezeptoraffinität im Vergleich zu nicht-ischämischem Vorhofmyokard.

Eine Aussage über die Funktion bzw. die Aktivierbarkeit des Rezeptors läßt sich anhand dieser Studie nicht machen.

#### 4. Zusammenfassung

Ausgangspunkt dieser Studie war die in der Literatur vorbeschriebene Dysregulation der intracellulären Calciumhomöostase als einer der Mechanismen für durch Ischämie und/oder Reperfusion hervorgerufene Myokardschädigungen.

Bei einer Fülle von Daten aus dem tierexperimentellen Bereich gibt es nur wenige Studien, die sich mit dem intracellulären Calciumprocessing während reversibler Ischämie und Reperfusion in humanem Myokardgewebe befassen. Dies muß sicherlich auf den limitierten Zugang zu humanen Gewebeproben zurückgeführt werden.

Ziel dieser Studie war die Bestimmung des Einflusses von reversibler Ischämie und Reperfusion auf die Dichte des Ryanodin-sensitiven Calciumfreisetzungskanals des sarkoplasmatischen Reikulums sowie des sakolemmalen L-Typ Calciumkanals als zwei wichtige Schaltstellen des intracellulären Calciumcyclings.

Diese wurden an humanem rechtsatrialen Myokard - gewonnen während kardiochirurgischer Eingriffe – mittels Radioligandenbindung bestimmt.

Es konnte eine signifikante Dichtereduzierung (25%) des Calciumfreisetzungskanals des sarkoplasmatischen Retikulums sowohl während Ischämie als auch während 30 minütiger Reperfusion im Vergleich zu Kontrollgewebe festgestellt werden. Die Affinität des Liganden zum Rezeptor, ebenso wie die Calciumabhängigkeit der Ryanodinbindung blieben unverändert.

Eine Subanalyse der Daten zeigte weiterhin keine Abhängigkeit dieser Dichtereduzierung von der kardialer Grunderkrankung der Patienten sowie von der vorbestehenden Medikation.

Eine Aussage bezüglich der physiologischen Wertigkeit dieser Dichtereduzierung, also ob eine Downregulierung oder eine Denaturierung der Kanäle vorliegt, ist anhand dieser Daten nicht möglich.

Eine weitere Einschränkung der Aussage dieser Arbeit besteht darin, daß methodisch bedingt eine Einflußnahme auf die Kanäle durch die erforderliche Cardioplegie und Hypothermie nicht auszuschließen ist.

Die Dichte der sakolemmalen spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanäle war unverändert in ischämischem und reperfundiertem Vorhofmyokard bei ebenfalls unveränderter Affinität des

Liganden zum Rezeptor. Auch hier kann keine physiologische Aussage bezüglich der Kanalfunktion und/oder Aktivierbarkeit getroffen werden.

Auch die Unteranalyse der Daten des L-Typ-Calciumkanals zeigte keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Patientensubpopulation oder Medikation.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die hier gezeigte Dichteminderung des Calciumfreisetzungskanals vielen tierexperimentellen und Daten von humanem Gewebe entspricht, die auf eine Aktivitätsminderung des Freisetzungskanals während Ischämie und Reperfusion hindeuten (Valdivia und Mentzer, 1997; Darling und Meissner, 1992; Zuchi und Mariani, 1994). Mittels der Radioligandenbindungsmethode lassen sich zwar keine physiologischen Daten ermitteln, jedoch bindet das Alkaloid Ryanodin nur an den aktivierbaren Calciumfreisetzungskanal, was die Hypothese der Aktivitätsminderung des Kanals weiter unterstützt. Außerdem ist ein wesentlicher physiologischer Parameter des Calciumfreisetzungskanals, nämlich die Calciumabhängigkeit der Ryanodinbindung unverändert. Dies bedeutet, daß die gemessenen Unterschiede in der Rezeptordichte nicht durch eine veränderte Calciumsensitivität der Ryanodinbindung bedingt sind. Außerdem ist die physiologische Calciumabhängigkeit der Ryanodinbindung nicht, wie bei bestimmten Herzerkrankungen, z. B.: Cardiomyopathien (Schotten, 1999), nicht verändert.

Die Tatsache, daß in dieser Studie eine unveränderte Dichte der sarkolemmalen L-Typ Calciumkanäle gezeigt werden konnte, entspricht der Hypothese, daß die ischämische Schädigung vor allem das intracelluläre Calciumcycling betrifft und nicht so sehr den Calciumeinstrom von extrazellulär.

Einschränkend muß allerdings gesagt werden, daß durch die Radioligandenbindung keine physiologischen Daten zu erheben sind und daß insbesondere in diesem Modell durch Cardioplegie und Hypothermie Einwirkungen auf den L-Typ Calciumkanal denkbar sind.

Im weiteren ist besonders die Erhebung von physiologischen Daten z. B.: Calciumtransienten, Kontraktionsverhalten und Calciumströmen wünschenswert um tieferen Einblick in das auch klinisch relevante Phänomen der reversiblen ischämischen Myokardschädigung zu erhalten.

## 6. Quellenangaben:

Van Amsterdam FTHM, van Amsterdam-Magnoni MS, Haas M, Punt NC, Zaagsma J: Protection by verapamil and nifedipine against ischemia-induced loss of  $^3\text{H}$ -PN 200-110 binding sites in the rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 341: 137-142, 1990

Barry WH: Is 'fuzzy space' necessary for  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion on the Na/Ca exchanger in cardiac myocytes? *J Mol Cell Cardiol* 25:641-646, 1993

Bolli R: Myocardial 'Stunning' in man. *Circulation* 86: 1671-1691, 1992

Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254, 1976

Bünnemann M., Gerhardstein BL, Gao T, Hosey MM: Functional regulation of L-Type calcium channels via protein kinase A – mediated Phosphorylation of the  $\beta$  2 subunit. *J. Biol Chem* 274: 33851-33854; 1999

Cheng Y and Prusoff WH: Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition ( $\text{IC}_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22: 3099-3108, 1973

Darling EM, Lai FA, Meissner G: Effects of regional ischemia on the ryanodine-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  release channel in canine cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol* 24: 1179-1188, 1992

Fabiato A: Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 245: H59-H66, 1983

Hearse DJ: Cardioplegia. *Postgraduate Med J* 59 (Suppl 2): 11-24, 1983

Meissner G: Ryanodine activation and inhibition of the  $\text{Ca}^{2+}$  release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 261: 6300-6306; 1986

Holmberg SR, Williams AJ: The cardiac sarcoplasmic reticulum calcium-release channel: modulation of ryanodine binding and single-channel activity. *Biochim Biophys Acta* 28: 187-193, 1990

Imagawa T, Smith JS, Coronado R, Campbell KP: purified ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum is the  $Ca^{2+}$  permeable pore of the calcium release channel. *J Biol Chem* 262: 16636-16643, 1987

Inui M, Saito A, Fleischer S: Isolation of the ryanodine receptor from cardiac sarcoplasmic reticulum and identity with the feet structure. *J Biol Chem* 262: 15637-15642, 1987

James P, Inui M, Tada M, Chiesi M, Carafolli E: Nature and site of phospholamban regulation of the  $Ca^{2+}$  pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature* 342: 90-92, 1989

Kirchberger MA, Tada M, Katz AM: Adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase-catalysed phosphorylation reaction and its relationship to calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 249: 6166-6173, 1974

Krause S, Hess ML: Characterization of cardiac sarcoplasmic reticulum dysfunction during short-normothermic, global ischemia. *Circ Res* 55: 176-184, 1984

Kusuoka H, Koretsune Y, Chacko VP, Weisfeldt ML, Marban E: Excitation-Contraction coupling in postischemic myocardium. Does failure of activator  $Ca^{2+}$  -transients underlie stunning? *Circ Res* 66:1268-1276, 1990

Lai FA, Erickson HP, Rousseau E, Liu QY, Meissner G: Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature* 331: 315-319, 1988

MacLennan DH, Wong PT: Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:1231-1235, 1971

Maisel AS, Motulsky HJ, Insel PA: Propranolol treatment externalizes beta-adrenergic receptors in guinea pig myocardium and prevents further externalization by ischemia. *Circ Res* 60:108-112, 1987

Maisel AS, Motulsky HJ, Ziegler MG, Insel PA: Ischemia- and agonist-induced changes in alpha- and beta-adrenergic receptor-traffic in guinea pig hearts. *Am J Physiol* 253: H1159-H1166, 1987

Movsesian MA, Leveille C, Krall J, Colyer J, Wang JH, Campbell KP: Identification and characterisation of proteins in sarcoplasmic reticulum from normal and failing human left ventricles. *J Mol Cell Cardiol* 22:1477-1485, 1990

Myers ML, Bolli R, Lekich RF, Hatley CJ, Roberts R.: Enhancement of recovery of myocardial function by oxygen free-radical scavengers after reversible regional ischemia. *Circulation*. 72:915-21,1985

Nayler WG, Dillon JS, Elz JS, McKelvie M: An effect of ischemia on myocardial dihydropyridine binding sites. *Eur J Pharmacol* 115: 81-89, 1985

Scatchard G: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 51: 660-672, 1949

Schmidt U, Schwinger RHG, Böhm S, Überfuhr P, Kreuzer E, Reichart B, v.Meyer L, Erdmann E, Böhm M: Evidence for an interaction of halothane with the L-type Ca<sup>2+</sup> channel in human myocardium. *Anesthesiology* 79: 332-339, 1993

Schotten U, Schumacher C, Conrads V, Braun V, Schöndube F, Voss M, Hanrath P.: Calcium-sensitivity of the SR calcium release channel in failing and nonfailing human myocardium. *Basic Res Cardiol*. 94(3):145-51, 1999

Steenbergen C, Murphy E, Levy L, London RF: Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. *Circ Res* 60:700-707, 1987

Valdivia C, Hedge JO, Lasley RD, Valdivia HH and Mentzner R: Ryanodine receptor dysfunction in porcine stunned myocardium. *Am J Physiol* 273: H796-H804, 1997

Waterhouse AI, Pessah IN, Francini AO, Casida JE: Structural aspects of ryanodine action and selectivity. *J Med Chem* 30: 710-716, 1987

Wegener AD, Simmermann HK, Liepiecks J, Jones LR: Proteolytic change of phospholamban purified from canine cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. Generation of a low resolution mode of phospholamban structure. *J Biol Chem* 261: 5154-5159, 1986

Welling A, Kwan YW, Bosse E, Flockerzi V, Hofmann F, Kass RS: Subunit-dependent modulation of recombinant L-type calcium channels. Molecular basis for dihydropyridine tissue selectivity. *Circ Res* 73: 974-980, 1993

Yellon DM, Alkhulaifi AM and Pugsley WB: Preconditioning the human myocardium: *Lancet* 342: 276-277, 1993

Zorzato F, Fujii J, Otsu K, Phillips M, Green NM, Lai FA, Meissner G, MacLennan DH: Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 265: 22444-56, 1990

Zühlke RD and Reuter H: Ca<sup>2+</sup>-sensitive inactivation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels depends on multiple cytoplasmic amino acid sequences of the  $\alpha_{1C}$  subunit. *Proc Natl Acad Sci* 95: 3287-3294, 1998

Zucchi R, Ronca-Testoni S, Di Napoli P, Yu, G., Gallina S, Bosco G, Ronca G, Calafiore AM, Mariani M and Barsotti A: Sarcoplasmic reticulum calcium uptake in human myocardium subjected to ischemia and reperfusion during cardiac surgery. *J. Mol Cell Cardiol*: 28: 1693-1701, 1996

Zucchi R, Ronca-Testoni S, Yu G, Galbani P, Ronca G and Mariani M: Are dihydropyridine receptors downregulated in the ischemic myocardium? *Cardiovasc Res*: 769-774, 1995

Zucchi R , Ronca-Testoni S, Yu G, Galbani P, Ronca G and Mariani M: Postischemic changes in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> channels. *Circ Res* 76:1049-1056; 1995

Zucchi R, Ronca-Testoni S, Yu G, Ronca G, Mariani M: Effect of ischemia and reperfusion on cardiac ryanodine receptors — sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> channels. *Circ Res* 74: 271-280, 1994

Zucchi R ,Ronca-Testoni S, Galbani P, Yu G , Ronca G and Mariani M: Cardiac A2 adenosine receptors — influence of ischemia. *Cardiovasc Res* 26: 549-554, 1992

## **A Danksagungen**

Ich danke Herrn Prof. P. Hanrath für die Möglichkeit der Erstellung dieser Arbeit und für deren Begutachtung sowie Herrn Prof F. Schöndube für die Übernahme des Koreferats und Herrn Dr. med B. Königs für die Betreuung der Studie.

Besonderer Dank gebührt Herrn Prof. B.J. Messmer und Herrn Prof F. Schöndube für die hervorragende Kooperation bezüglich der Biopsatentnahme während der kardiochirurgischen Eingriffe.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. med U. Schotten und Herrn Dr. med. B. Koenigs für wissenschaftliche und moralische Unterstützung und Beratung zu jeder Zeit danken.

Herrn Prof. P. Hanrath, Herrn Dr. med. B Königs und Herrn Dr. med. U. Schotten möchte ich besonders für die Förderung meiner eigenständigen Arbeit danken.

## **B Lebenslauf**

Birte Maura Greiser

Eltern: Dr.med Udo Greiser

Sigrid Greiser, geb. Luther

22.10.1971	geboren in Münster/ Westfalen
1978 - 79	Besuch der evangelischen Grundschule in Burgsteinfurt
1979 -82	Besuch der Grundschule Lage - Ehrentrup
1982 - 91	Besuch des städtischen Gymnasiums der Stadt Lage
1987-1988	Besuch der Burlington Highschool, Burlington , Ontario, Canada
1991	Allgemeine Hochschulreife
1991 - 95	Studium der Humanmedizin in der Philipps-Universität Marburg
1995 - 1999	Studium der Humanmedizin an der Rheinisch- Westfälisch Technischen Hochschule Aachen
10/1998 - 10/1999	Praktisches Jahr an der University of Texas in Houston;
12/1999	3. Staatsexamen
Seit 02/2000	Ärztin im Praktikum an der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums der Rheinisch-Westfälisch Technischen Hochschule Aachen

## C Publikationsliste

1. Greiser M, Doerge H, Vazquez-Jimenez JF, Schotten U, Schöndube F, Hanrath P, Koenigs B. Reduced density of sarcoplasmic reticulum calcium release channel in human ischemic and reperfused myocardium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998; R 69: 261 (abstr.)
2. Koenigs B, Greiser M, Doerge H, Vazquez-Jimenez JF, Hanrath P. Reduced density of sarcoplasmic reticulum calcium release channel in human ischemic and reperfused myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2000;35 (2) Suppl A:379 (abstr)
3. Koenigs B, Greiser M, Doerge H, Vazquez - Jimenez JF, Hanrath P. Reduced density of sarcoplasmic reticulum calcium release channel in human ischemic and reperfused myocardium. *Eur Heart J* 1998; 19: 176 (abstr)
4. Koenigs B, Greiser M, Doerge H, Vazquez-Jimenez JF, Schotten U, Schöndube F, Hanrath P. Reduzierte Dichte des Freisetzungskanals des sarkoplasmatischen Retikulums in humanem ischämischen und reperfundierten Myokard. *Zeitschrift für Kardiologie* 1997; 3:265 (abstr)