

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Freien Universität Berlin
(Direktor Prof. Dr. med. Martin Paul)

**Die frühe Expression der Isoformen
des Natrium-Protonen-Austauschers
im experimentellen Myokardinfarkt der Ratte**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Dalana Tolic
aus Jajce

Referent: Prof. Dr. med. Martin Paul

Koreferent: Prof. Dr. med. B. Wittig

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Humanmedizin der Freien Universität Berlin

Promoviert am 13. September 2002

INHALTSVERZEICHNIS	I
ZUSAMMENFASSUNG	III

1 EINLEITUNG FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

1.1 Kardiovaskuläres System Fehler! Textmarke nicht definiert.

1.2 Regulation des pH-Wertes im Myokard Fehler! Textmarke nicht definiert.

1.3 Natrium-Protonen-Austauscher (NHE) Fehler! Textmarke nicht definiert.

1.3.1 Rolle des Austauschers während der Ischämie und Reperfusion **Fehler! Textmarke nicht definiert.**

1.3.2 Woher kommt der Zellschaden **Fehler! Textmarke nicht definiert.**

1.3.2.1 Calciumüberschuss, ein zentraler Punkt **Fehler! Textmarke nicht definiert.**

1.3.2.2 pH-Paradox **Fehler! Textmarke nicht definiert.**

1.3.2.3 Andere Ursachen für den Zellschaden **Fehler! Textmarke nicht definiert.**

1.3.3 Hemmstoffe des Natrium-Protonen-Austauschers **Fehler! Textmarke nicht definiert.**

1.3.4 Hemmung des Natrium-Protonen-Austauschers **Fehler! Textmarke nicht definiert.**

1.3.5 Molekulare Regulation des Natrium-Protonen-Austauschers **Fehler! Textmarke nicht definiert.**

1.3.6 Neurohumorale Modulation des Natrium-Protonen-Austauschers **Fehler! Textmarke nicht definiert.**

2 MATERIAL UND METHODEN FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

2.1 Organpräparation der Tiere Fehler! Textmarke nicht definiert.

2.2 rt-PCR Fehler! Textmarke nicht definiert.

2.2.1 Isolierung von RNA 22

2.2.2 Reverse Transkription 23

2.2.3 PCR-Amplifikation 24

2.3 Klonierung der Sonden für die in situ Hybridisierung 27

2.3.1 Transformation 28

2.3.2 DNA-Mini-Präparation 28

2.3.3 DNA-Maxi-Präparation 30

2.4 In situ Hybridisierung 32

2.4.1 Herstellung der Gefrierschnitte 32

2.4.2 Herstellung der Hybridisierungs-Sonden 33

2.4.2.1 Linearisierung der Plasmide 33

2.4.2.2 Transkription 34

2.4.3 Hybridisierung 36

2.4.3.1 Vorbereitung der Gewebeschnitte für die Hybridisierung 37

2.4.3.2 Waschen der Gewebeschnitte nach beendeter Hybridisierung 39

2.4.4 Autoradiographie 40

2.4.5	Photo-Dokumentation	42
2.4.6	Auswertung	42
2.5	Statistische Auswertung	42
3	ERGEBNISSE	43
3.1	rt-PCR	43
3.1.1	rt-PCR von rNHE-1	43
3.1.2	rt-PCR von rNHE-2	44
3.1.3	rt-PCR von rNHE-3	45
3.1.4	rt-PCR von rNHE-4	46
3.2	Klonierung der Sonden für die in situ Hybridisierung	47
3.2.1	rNHE-1	48
3.2.2	rNHE-3	49
3.2.3	rNHE-4	50
3.3	In situ Hybridisierung	50
3.3.1	Fotografische Darstellung der rNHE-1-Ergebnisse	51
3.3.2	Fotografische Darstellung der rNHE-3-Ergebnisse	53
3.3.3	Fotografische Darstellung der rNHE-4-Ergebnisse	55
3.3.4	Graphische Darstellung der rNHE-1 - Ergebnisse	57
3.3.5	Graphische Darstellung der rNHE-3 – Ergebnisse	60
3.3.6	Graphische Darstellung der rNHE-4 - Ergebnisse	63
4	DISKUSSION	66
5	BIBLIOGRAPHIE	74
6	ANHANG	85
6.1	Verzeichnis häufig gebrauchter Lösungen und Puffer	85
6.2	Verzeichnis der benutzten Abkürzungen	91

Zusammenfassung

Einleitung

Der Natrium-Protonen-Austauscher ist neben dem Protein Histidin, dem $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher und $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Cotransporter an der pH-Regulation der Zelle beteiligt. Man hat jedoch beobachtet, dass der Natrium-Protonen-Austauscher im physiologischen pH-Bereich eher unbedeutend ist. Mit fallendem intrazellulärem pH-Wert wird der Antiporter schnell aktiviert und erreicht seine maximale Transportrate bei einem intrazellulären pH-Wert von 1, indem er ein extrazelluläres Na^+ gegen ein intrazelluläres H^+ durch die Plasmamembran austauscht. Die Folge ist eine intrazelluläre Akkumulation von Natrium. Die Ausstoßung von Natrium durch die Na/K-ATPase nimmt mit fallendem Energiegehalt der Zelle ab. Der erhöhte intrazelluläre Gehalt an Na^+ kann zu einer Aktivierung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers führen, der ein intrazelluläres Na^+ gegen ein extrazelluläres Ca^{2+} austauscht. Die Folge ist eine intrazelluläre Akkumulation von Calcium. Zellnekrose, Kontraktionen und Arrhythmien können die Folge sein.

Die Herzmuskelzellen können sich nicht vollständig regenerieren. Jeder ischämische Verlust ist gleichzeitig ein bleibender Verlust der Herzfunktion. Deshalb ist es besonders wichtig, die Mechanismen genau zu untersuchen und zu verstehen, um Wege zu finden, welche den Schaden, der durch die Ischämie hervorgerufen wird, verhindern oder verringern. Der Natrium-Protonen-Austauscher könnte einen wichtigen Angriffspunkt für die pharmakologische Intervention zum Schutz des Myokards vor dem Schaden während der Ischämie und der Reperfusion darstellen.

Hypothese

In dieser Arbeit wird die Hypothese untersucht, dass eine oder mehrere Isoformen des Natrium-Protonen-Austauschers ein unterschiedliches Frühexpressionsverhalten im experimentellen Myokardinfarkt der Ratte (bis maximal 7 d nach dem Infarkt), verglichen mit dem Kontrollmyokard, aufweisen.

Methodik

Um diese Hypothese zu untersuchen, erfolgt ein experimentell induzierter Myokardinfarkt der Ratte durch die permanente Ligation des Ramus interventrikularis anterior. Bei den Kontrolltieren erfolgt die Scheinoperation, bei der man den Knoten neben der A. coronaria sinistra in den Herzmuskel setzt. Die Tiere werden jeweils nach 30 min., 3 h, 6 h, 24 h, 72 h und 7 d getötet. Aus dem Myokard gewonnene RNA wird mittels Reverser Transkriptase in die cDNA umgeschrieben. Anschließend wird eine qualitative rt-PCR vor dem Hintergrund durchgeführt, ob verschiedene Isoformen des Natrium-Protonen-Austauschers (NHE 1-4) im Myokardgewebe nachzuweisen sind. Mit Hilfe der in situ Hybridisierung kann die Expression der mRNA des Natrium-Protonen-Austauschers direkt auf dem zu untersuchenden Gewebe dargestellt werden. Die radioaktiv markierten Sonden binden an die im Gewebeschnitt gesuchte mRNA. Die RNA-Sonden fungieren als Antisense-Positivkontrolle bzw. Sense-Negativkontrolle. Die so gegebenenfalls radioaktiv markierten RNA-Hybride werden durch Zählung der Silberkörner pro Zellkern quantifiziert. Die Ergebnisse der beiden Gruppen (Myokardinfarkt und Kontrollgruppe) werden miteinander verglichen.

Ergebnisse

Die rt-PCR ergibt, dass rNHE-1, rNHE-3 und rNHE-4 sowohl im Infarktmyokard als auch im Kontrollmyokard exprimiert werden. Eine *quantitative* Aussage mit Hilfe der *qualitativen* PCR zu machen, ist nicht möglich. Außerdem ergibt die rt-PCR, dass rNHE-2 weder im Infarkt-, noch im Kontrollmyokard bei gleichzeitig deutlich positivem Signal in der positiven Kontrolle (Dünndarm) exprimiert wird. Somit lässt sich feststellen, dass die Isoform rNHE-2 im Rattenmyokard nicht exprimiert wird. Die Ergebnisse der in situ Hybridisierung sind zum Teil signifikant. Einen signifikanten Unterschied zwischen dem Infarktmyokard und dem Kontrollmyokard gibt es bei der rNHE-4-Isoform. Bei den Isoformen rNHE-1 und rNHE-3 ergeben sich Unterschiede im Expressionsniveau zwischen dem Infarktmyokard und dem Kontrollmyokard. Das Expressionsniveau im Infarktmyokard ist in nahezu allen Fällen höher, als im Kontrollmyokard, das Ergebnis ist jedoch nur zum Teil signifikant.

Schlussfolgerung

Die Hypothese, dass eine oder mehrere Isoformen des Natrium-Protonen-Austauschers eine unterschiedliche Expression zwischen dem experimentellen Myokardinfarkt der Ratte (bis max. 7 Tage nach dem Infarkt) und dem Kontrollmyokard aufweist, kann nur bestätigt werden. Einen signifikanten Unterschied gibt es zwischen dem Infarktmyokard und dem Kontrollmyokard bei der rNHE-4 Isoform. Bei den Isoformen rNHE-1 und rNHE-3 gibt es Unterschiede im Expressionsniveau, jedoch ist das Ergebnis nur zum Teil signifikant. Außerdem lässt sich feststellen, dass die Isoform rNHE-2 im Rattenmyokard nicht exprimiert wird.