

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III
des Universitätsklinikums Halle (Saale)
(Direktor: Prof. Dr. med. Karl Werdan)

**Kardioprotektive Effekte des *Bone Morphogenetic Protein 2* im
Herzinfarktmodell der Maus**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr.med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von Ina Dorothea Hillebrand, geb. Bosbach
geboren am 13.02.1981 in Wuppertal

Betreuer: PD Dr. med. habil. H. Ebel
Gutachter: Prof. Dr. med. S. Rohbach
Prof. Dr. med. S. Felix

Eröffnungsdatum des Promotionsverfahrens: 30.11.2010

Datum der Verteidigung: 30.05.2011

*Der erste Schluck aus dem Becher der Wissenschaft führt zum Atheismus
aber auf dem Grund wartet Gott*

Werner Heisenberg

Meiner Familie

Referat:

Der akute Myokardinfarkt (AMI) ist eine der Haupttodesursachen in den westlichen Industrienationen. Der Einsatz von Behandlungsstrategien, die zu einer schnellen Reperfusion des ischämischen Myokards führen, hat in den letzten Jahren die Letalität des AMI gesenkt. Dennoch liegt auch unter idealen Bedingungen zwischen Infarktdiagnose und kompletter Reperfusion des Myokards eine kritische Zeitspanne, in der zusätzliche Verfahren zur Myokardprotektion eingesetzt werden könnten. Verschiedene Strategien der Präkonditionierung führen in tierexperimentellen Untersuchungen zu einer Verbesserung der myokardialen Ischämietoleranz. Die vorliegende Arbeit umfasst Untersuchungen bezüglich protektiver Effekte des *Bone morphogenetic protein 2* (BMP2) auf Kardiomyozyten unter Stressbedingungen. In Zellkulturexperimenten wurde der Einfluss von BMP2 auf die Schlagfrequenz und Kontraktilität von isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten sowie auf die Apoptoserate adulter Kardiomyozyten unter Hypoxie bzw. in Gegenwart von H₂O₂ untersucht. In einem *in vivo*-Modell wurde BMP2 adulten ICR-Mäusen 30 Minuten vor der Induktion eines Myokardinfarktes intravenös appliziert, und die daraus resultierenden Veränderungen wurden mittels serieller Echokardiographie sowie durch histologische Untersuchungen erfasst. Weiterhin wurden Teile der Lunge, der Leber und des Zwerchfells lichtmikroskopisch auf pathologische Veränderungen geprüft. Im Ergebnis zeigt sich, dass BMP2 das Überleben der Versuchstiere nach einem akuten Myokardinfarkt verbessert. Insbesondere Tiere mit sehr großen Infarkten, die in der Kontrollgruppe bereits früh nach der Infarktinduktion versterben, überleben nach BMP2-Gabe. Anhalt für unerwünschte Wirkungen, wie ektope Verknöcherungen oder eine gesteigerte interstitielle Fibrose in benachbarten Organsystemen (Lunge, Leber und Zwerchfell) finden sich hierbei nicht. Die Zellkulturexperimente belegen, dass die Gabe von BMP2 unter Bedingungen von erhöhtem oxidativen Stress antiapoptotische Effekte entfaltet, die Hypoxie-Resistenz von Kardiomyozyten verbessert und zu kontraktilitätssteigernden Effekten an isolierten Kardiomyozyten führt. Daher könnte die Gabe von BMP2 möglicherweise einen vielversprechenden Therapieansatz zur Myokardprotektion darstellen.

Inhaltsverzeichnis:

	Seite	
1.	Einleitung	1
1.1	Koronare Herzkrankheit	1
1.1.1	Pathogenese der koronaren Herzkrankheit	1
1.1.2	Pathogenese des akuten Myokardinfarktes	2
1.1.3	Behandlung des akuten Myokardinfarktes	3
1.1.4	Folgen des akuten Myokardinfarktes	5
1.2	Apoptose	6
1.2.1	Mechanismen der Apoptose	6
1.2.2	Apoptose im Herzen	9
1.3	Experimentelle Ansätze zur Myokardprotektion	9
1.4	<i>Bone morphogenetic proteins</i>	11
1.4.1	Familie der <i>Bone morphogenetic proteins</i>	11
1.4.2	Zelluläre Signaltransduktion	12
1.4.3	Intrazelluläre Signalkaskade	13
1.4.4	Regulationsmechanismen der BMP-Signaltransduktion	14
1.4.5	BMP2	16
2.	Zielstellung	18
3.	Material und Methoden	19
3.1	Herstellung des BMP2 und Nachweis der biologischen Aktivität	19
3.2.	<i>In vivo</i> -Untersuchungen	19
3.2.1	Mäuse	19
3.2.2	Herzinfarktmodell	20
3.2.3	Echokardiographie	21
3.2.4	Fixation und Präparateherstellung	22
3.2.5	Herstellung der Schnittpräparate	23
3.2.6	Trichrom-Färbung der Präparate und Infarktgrößenbestimmung	23
3.2.7	Bestimmung der Myozytenquerschnittsflächen (MCSA)	24
3.2.8	Bestimmung der interstitiellen Kollagen-Fraktion (ICF)	25
3.3	Zellkultur	26
3.3.1	Zellpräparation	26
3.3.2	Untersuchungen zur BMP2-induzierten Stressresistenz adulter Rattenkardiomyozyten	28
3.3.3	Bestimmung der Auswirkungen von BMP2 auf Kontraktilitätsparameter neonataler Rattenkardiomyozyten	30

3.4	Reagenzien	30
3.5	Statistik	33
4.	Ergebnisse	34
4.1	Nachweis der biologischen Aktivität von BMP2	34
4.2	<i>In-vivo</i> -Untersuchungen	34
4.2.1	Morphometrie	35
4.2.2	Überlebensanalyse	36
4.2.3	Echokardiographie	37
4.2.4	Bestimmung der Infarktgrößen	48
4.2.5	Bestimmung des Postinfarkt-Remodelings	40
4.2.6	Lichtmikroskopische Untersuchung der Organpräparate von Lunge, Leber und Zwerchfell	44
4.3	Zellkulturversuche	44
4.3.1	Auswirkungen von BMP2 auf isolierte Kardiomyozyten unter oxidativem Stress und Hypoxie	44
4.3.2	Wirkungen von BMP2 auf Kontraktilitätsparameter neonataler Rattenkardiomyozyten	51
5.	Diskussion	54
6.	Schlussfolgerungen	68
7.	Zusammenfassung	69
8.	Literaturverzeichnis	70
9.	Thesen	77
10.	Lebenslauf	
11.	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis:

ActR-IA	Aktivin-Rezeptor Typ IA
ACS	Akutes Koronarsyndrom
AIF	<i>Apoptosis-inducing factor</i>
AMI	Akuter Myokardinfarkt
BAMBI	BMP- und Aktivin- membrangebundener Inhibitor
B-Mode	B-Scan der Ultraschalldiagnostik
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BMP2	<i>Bone morphogenetic protein 2</i>
BMPR-IA	<i>Bone morphogenetic protein</i> Rezeptor Typ IA
BMPR-IB	<i>Bone morphogenetic protein</i> Rezeptor Typ IB
c-DNA	<i>complementary desoxyribonuklein acid</i>
CK	Creatin-Kinase
DISC	<i>Death-inducing signalling complex</i>
DNA	<i>Desoxyribonuklein acid</i>
dpp	<i>Drosophila decapentaplegic</i> -Genprodukte
EF	Ejektionsfraktion
EndoG	Endonuklease G
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAC	<i>Fraction of area change</i> , 2-dimensionaler Parameter der linksventrikulären Pumpfunktion in der Echokardiographie
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>
FKBP12	<i>FK506 binding protein-12</i>
FS	<i>shortening fraction</i> , fraktionelle systolische Durchmesserverkürzung, eindimensionaler Parameter der linksventrikulären Pumpfunktion in der Echokardiographie
GDF	<i>Growth and differentiation factors</i>
GDNF	<i>Glia cell line-derived neurotrophic factor</i>
GKR	Gewebekulturröhrchen
HDAC	Histon-Deacetylase
ICF	<i>Interstitial collagen fraction</i> ; Interstitieller Kollagenanteil
IGF-1	<i>Insulin-Like Growth Factor -1</i>
i.p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	<i>low density</i> -Lipoprotein

LAD	<i>left anterior descending branch</i> , Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie
LVIDD	Linksventrikulärer diastolischer Innen-Diameter
LVIDS	Linksventrikulärer systolischer Innen-Diameter
LVFW	<i>left ventricular frontwall</i> ; linksventrikuläre Vorderwand
MCSA	<i>Myocyte cross section area</i> ; Myozytenquerschnittsfläche
MH-1/-2	<i>Mad-Homology-Domäne-1/-2</i>
MIS	<i>Müllerian inhibiting substance</i>
MMP	Matrixmetalloprotease
MPTP	<i>Mitochondrial-permeability-transition-pore</i>
NSTEMI	Nicht-ST-Strecken-Hebungs-Infarkt
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PI-3	Phosphoinositol 3-Kinase
PP2A	Protein-Phosphatase 2A
SARA	<i>Smad anchor receptor activation</i>
SIP-1	<i>Smad interacting protein 1</i>
STEMI	ST-Strecken-Hebungs-Infarkt
Smurf-1	<i>Smad-ubiquination-regulatory-factor-1</i>
STRAP	Serin-Threonin-Kinase-Rezeptor-assoziiertes Protein
TGF- β	<i>Transforming-Growth-Factor β</i>
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
rt-PA	rekombinanter Tissue-Plasminogen-Aktivator
TRIP-1	TGF- β -Rezeptor interagierendes Protein 1
TSH	<i>Thyroid stimulating hormon</i> (Thyreotropin)

1. Einleitung

1.1 Koronare Herzkrankheit

1.1.1 Pathogenese der koronaren Herzkrankheit

Die koronare Herzkrankheit ist eine Erkrankung, bei der durch eine meist arteriosklerotisch bedingte Verengung der Herzkranzgefäße ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch des Herzmuskels entsteht. Die wichtigsten Manifestationsformen sind die Angina pectoris, der akute Myokardinfarkt (AMI) sowie durch den Sauerstoffmangel hervorgerufene Herzrhythmusstörungen bis hin zum plötzlichen Herztod. Unter dem Begriff „Akutes Koronarsyndrom“ (ACS) werden die unmittelbar lebensbedrohlichen Phasen der koronaren Herzkrankheit zusammengefasst. In der klinischen Praxis sind dies die instabile Angina pectoris und der akute Myokardinfarkt. Die Übergänge der klinischen Formen sind fließend, daher werden die betroffenen Patienten anhand des EKG Befundes in Gruppen mit ST-Strecken-Hebung (STEMI) oder ohne ST-Strecken-Hebung (NSTEMI) unterschieden, wobei die instabile Angina pectoris und der NSTEMI nicht anhand des EKG-Befundes differenziert werden können. Diese Einteilung wird durch unterschiedliche therapeutische Maßnahmen gerechtfertigt [1, 2].

Es existieren verschiedene Theorien zur Entstehung arteriosklerotischer Veränderungen an den Gefäßwänden. Durch zahlreiche epidemiologische Untersuchungen, wie der Framingham- und der MONICA-Studie, wurde gezeigt, dass verschiedene Risikofaktoren für die Entwicklung arteriosklerotischer Veränderungen existieren. Sowohl die Anzahl, als auch die Ausprägung der Risikofaktoren ist entscheidend für das individuelle Erkrankungsrisiko. Man unterscheidet beeinflussbare von nicht beeinflussbaren Risikofaktoren. Zu den beeinflussbaren Risikofaktoren werden Rauchen, Hyperlipoproteinämie, Diabetes mellitus, Hyperurikämie, Stress, Bewegungsmangel und die arterielle Hypertonie gezählt. Nicht beeinflussbare Risikofaktoren sind die familiäre Disposition, hormonelle Faktoren, männliches Geschlecht und das Alter [3, 4].

Der Auslöser der Arteriosklerose ist initial wahrscheinlich meist eine Endothelläsion, welche zum Beispiel bei arteriellem Hypertonus durch eine chronische mechanische Schädigung entstehen kann. Durch die entstehende Mikroläsion wird eine Thrombozytenanlagerung begünstigt. Die Thrombozyten setzen Mediatorsubstanzen frei, welche zu einer Einwanderung und Proliferation glatter Muskelzellen und Makrophagen in die Intima des Gefäßes führen. Durch die Aufnahme von oxidiertem *low density lipoprotein* (LDL) wandeln sich die Makrophagen in so genannte Schaumzellen um, die sich an den arteriosklerotischen Läsionen in der Intima der Gefäße in großer Anzahl anhäufen können [5]. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer fibrotischen Umwandlung des Gewebes mit einer fettigen Degeneration und Nekrose. Die entstandenen Plaques, auch als Atherome bezeichnet, können kalzifizieren und exulzerieren. Durch die geringe Elastizität des Plaques entstehen häufig Einrisse, die eine weitere Umwandlung des Gewebes mit einer zunehmenden Einengung des Gefäßlumens zur Folge haben. Durch den arteriosklerotischen Umbau verdickt sich die Gefäßinnenwand, und das Zusammenspiel zwischen Gefäßoberfläche und

Blutsystem kann nachhaltig gestört werden [5]. So wird unter anderem die Bildung von Embolien und Koronarthrombosen gefördert. Darüber hinaus scheint dem oxidierten LDL-Cholesterin eine entzündungsfördernde Rolle zu zukommen, wodurch die fibröse Kapsel eines Atheroms lytisch verändert werden kann [5]. Durch diese Mechanismen wird das so genannte Stenose-Paradox erklärt, nachdem nicht ausschliesslich die hochgradigen, symptomatischen Stenosen gefährlich sind, sondern insbesondere von „weichen“, angiographisch häufig kaum darstellbaren Plaques ohne oder mit zunächst nur geringer hämodynamischer Relevanz eine besondere Bedrohung ausgeht. Hier trifft das strömende Blut auf eine lytisch veränderte, ausgedünnte fibröse Kapsel, und es kann zur Ruptur des Atheroms kommen. Durch den Kontakt des thrombogenen Atherominhaltes mit dem fließenden Blut entsteht als Folge eine Koronarthrombose und damit meist ein akuter Myokardinfarkt [5].

Die Sauerstoffausschöpfung des Blutes in den Koronararterien ist im gesunden Herzen nahezu gleich bleibend hoch, eine Regulation des Sauerstoffangebotes erfolgt daher im Wesentlichen durch eine Steigerung der Koronarperfusion. Durch eine metabolische Autoregulation, die sich am Sauerstoffgehalt der Kardiomyozyten orientiert, werden die Koronargefäße erweitert. Eine Einengung des Gefäßlumens kann ab einem Stenosegrad von etwa 75% zu einer Minderdurchblutung des Herzmuskels bei Belastung führen und zeigt sich klinisch dann als stabile Angina pectoris. Noch höhergradige Stenosen führen schon in Ruhe zu einer chronischen Ischämie des Myokards und zeigen sich klinisch meist in einer (instabilen) Ruhe-Angina.

1.1.2 Pathogenese des akuten Myokardinfarktes

In dem überwiegenden Teil der Fälle tritt ein akuter Myokardinfarkt als Folge der Arteriosklerose der Herzkranzgefäße auf. Die Arteriosklerose entwickelt sich wie beschrieben durch einen sich über Jahre hinziehenden Krankheitsprozess, und in der Folge kommt es zu einer progredienten Verengung der Gefäßlumina der Koronararterien. Die Risikofaktoren für das Auftreten eines akuten Myokardinfarktes sind mit denen der koronaren Herzkrankheit identisch (siehe oben) [4].

Der akute Myokardinfarkt entsteht durch den Verschluss einer oder mehrerer Herzkranzarterien und ist als ein durch Ischämie bedingtes Absterben eines Teils des Herzmuskelgewebes definiert. In 80% der Herzinfarktfälle kann eine akute Koronarthrombose als Ursache der Ischämie identifiziert werden [6]. Aber auch in den restlichen 20% kann meist ein morphologisches Korrelat identifiziert werden. Häufig handelt es sich dabei um Einblutungen arteriosklerotischer Intimapolster, seltener liegen entzündliche Veränderungen an den Koronararterien oder Thrombembolien als Ursachen vor [6]. Pathoanatomisch findet sich bei Patienten, die an einem akuten Myokardinfarkt verstorben sind, in der weit überwiegenden Mehrzahl eine Ruptur einer intrakoronaren Plaque, wobei die Ruptur meist im Bereich einer vorbestehenden Stenose erfolgt [7].

Ausdehnung und Lokalisation des Koronarverschlusses beeinflussen maßgeblich die Symptomatik des Infarktes und die Prognose des betroffenen Patienten. Eine rechtzeitige medizinische

Intervention ist häufig lebensrettend und entscheidet über das Ausmaß der irreversiblen Myokarschädigung.

1.1.3 Behandlung des akuten Myokardinfarktes

Die Hauptziele der Behandlung des AMI ist die Senkung von Morbidität und Mortalität. Um diese Ziele zu erreichen, müssen medikamentöse und nichtmedikamentöse Verfahren sinnvoll eingesetzt werden.

Um eine effektive Therapie von akuten Koronarsyndromen (ACS) zu ermöglichen, erfolgt zunächst eine Unterscheidung anhand des EKG-Befundes in Infarkte mit ST-Strecken-Hebung (STEMI) und ACS ohne ST-Strecken-Hebung (NSTEMI-ACS).

Zur Initialtherapie des akuten Koronarsyndroms gehören die intravenöse Applikation von Acetylsalicylsäure (um ein weiteres Thrombuswachstum zu verhindern), eines schnell wirksamen Nitro-Präparates als Spray, die Sauerstoffapplikation und eine effiziente Schmerzstillung. Der Einsatz von ADP-Antagonisten (Clopidogrel) zusätzlich zu ASS hat in der CURE-Studie zu einer Senkung der kardiovaskulären Mortalität sowie der Rate nicht fataler Herzinfarkte und Schlaganfälle um 20% geführt, sodass eine Applikation mit einer initialen Sättigungsdosis zwischen 300 und 600mg empfohlen wird [8-10]. Weiterhin wird die Gabe von Heparin oder des Faktor-Xa-Inhibitor Fondaparinux beim akuten ACS empfohlen, um eine optimale Antikoagulation in Kombination mit ASS und Clopidogrel zu erreichen.

Die Entscheidung über die initiale Applikation eines GP-IIb/IIIa-Inhibitors, um die Thrombozytenaktivierung durch Besetzung des Fibrinogenrezeptors und dadurch die Aggregation von aktivierten Thrombozyten zu verhindern richtet sich nach dem weiteren Therapiekonzept. Besonders profitieren Hochrisikopatienten (Diabetiker, Troponin-positive Patienten). So konnte in einer Metaanalyse eine Senkung des 30 Tage-Risikos für Tod und AMI um 9% bei Patienten mit einem NSTEMI-ACS gezeigt werden, wenn diese vor und während einer PCI durchgeführt wurde [10, 11].

Bei tachykarden Rhythmusstörungen sollte die Gabe eines Betablocker erwogen werden, um den myokardialen Sauerstoffverbrauch weiter zu senken und um möglichen Arrhythmien entgegen zu wirken. Kontraindiziert ist die Gabe eines Betablockers allerdings bei akuter Herzinsuffizienz.

Zeigt sich bei der Ableitung eines 12-Kanal-EKG keine ST-Strecken-Hebung und hat der Patient in Ruhe seit mehr als 20 Minuten pectanginöse Beschwerden, die sich nicht durch die Applikation anti-ischämischer Medikamente wie sublingualen Nitraten innerhalb von 5 Minuten bessern, liegt ein NSTEMI-ACS vor, d.h. entweder ein NSTEMI oder eine instabile Angina pectoris. In diesem Fall sollten folgende Risikomerkmale geprüft werden: Troponinerhöhung, ST-Strecken-Senkungen in Ableitungen mit hoher R-Zacke, Zeichen der hämodynamischen Instabilität, Auftreten von Herzrhythmusstörungen, wiederholtes Auftreten von Angina-pectoris-Anfällen und Vorliegen eines

Diabetes mellitus. Wird eines bzw. mehrere solcher Risikomerkmale festgestellt, sollte innerhalb von 72 Stunden eine invasive Herzkatheterdiagnostik durchgeführt werden. Können keine Risikomerkmale nachgewiesen werden, muss wiederholt ein 12-Kanal-EKG geschrieben werden und ggf. ein kontinuierliches ST-Monitoring sowie weitere Troponin-Kontrollen erfolgen. Wird hierunter nun ein Risikofaktor sichtbar oder treten erneut pectanginöse Beschwerden auf, sollte ebenfalls eine invasive Herzkatheterdiagnostik angestrebt werden, anderenfalls ist ein weiteres nichtinvasives Vorgehen gerechtfertigt [11].

Wird durch die Ableitung des 12-Kanal-EKG ein ST-Strecken-Hebungs-Infarkt (STEMI) festgestellt, zielt die weitere Behandlung auf eine möglichst rasche Reperfusion des ischämischen Myokards [10, 11]. In Abhängigkeit von der Ausstattung des jeweiligen Krankenhauses kann dies mittels einer perkutanen Koronarintervention, einer Thrombolyse oder (im Ausnahmefall) durch eine Bypassoperation erfolgen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die invasive Behandlungsstrategie im Vergleich zur Fibrinolyse überlegen ist und die Infarktsterblichkeit signifikant senkt [1]. Ist eine interventionelle Versorgung allerdings erst mit einer Verzögerung von mehr als 90 Minuten möglich, sollte nach Ausschluss von Kontraindikationen mit der Fibrinolyse begonnen werden. Sie ist in den ersten drei Stunden nach Schmerzbeginn besonders wirksam. Für die medikamentöse Fibrinolyse ist eine Senkung der Mortalität für einen Zeitraum von 12 Stunden von Symptombeginn bis zum Beginn der Lysetherapie nachgewiesen. In Deutschland stehen die Medikamente Streptokinase, Alteplase, Reteplase und Tenecteplase für den klinischen Gebrauch zur Verfügung.

Der Langzeiterfolg der Therapie des akuten Myokardinfarktes ist abhängig von der Reduktion der vorhandenen Risikofaktoren sowie der Durchführung aktiver Maßnahmen der Sekundärprävention. Dies beinhaltet, dass das LDL-Cholesterin auf einen Wert unter 100mg/dl reduziert werden sollte. Ebenfalls gilt es, die Hypertonie günstig zu beeinflussen und idealerweise auf normotone Werte einzustellen, den Diabetes mellitus auf normoglykämische Werte zu bringen, und den Patienten zur Nikotinkarenz zu führen. Weiterhin sollte das Körpergewicht normalisiert, regelmäßige sportliche körperliche Betätigung so wie eine Schlaf- und Entspannungshygiene betrieben werden und eine jährliche Gripeschutzimpfung erfolgen [2, 12].

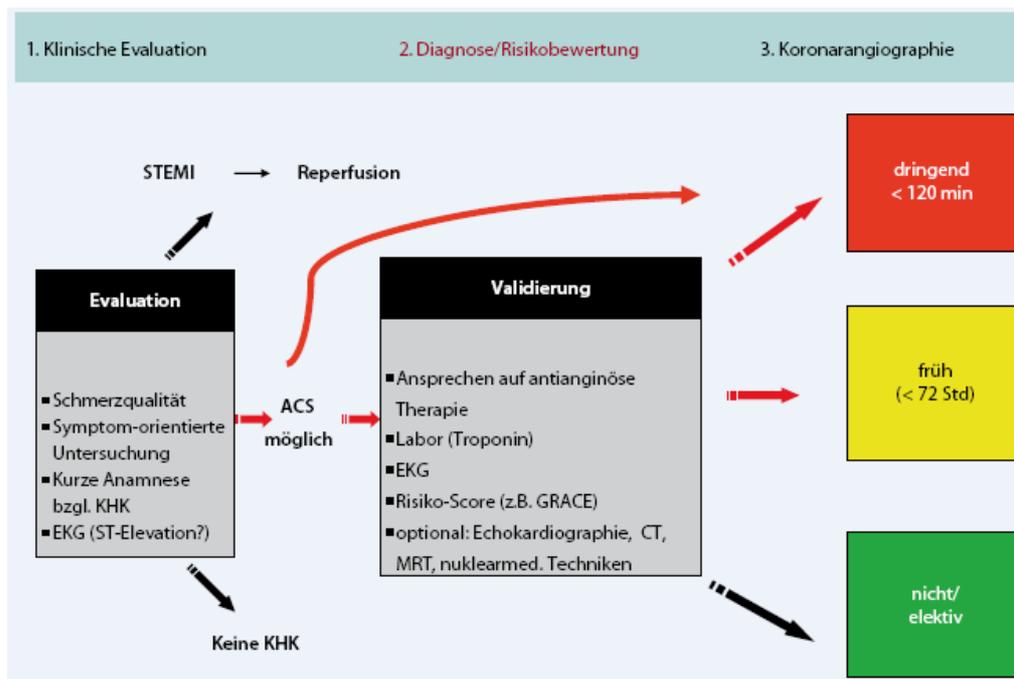


Abb.1: Handlungsregime bei Verdacht auf ein ACS [11]

1.1.4 Folgen des akuten Myokardinfarktes

Die Langzeitfolgen des Myokardinfarktes sind maßgeblich abhängig von der Größe des zugrunde gegangenen Gewebe-Areals. Der Verlust von kontraktilem Myokardgewebe durch einen Herzinfarkt führt unmittelbar zu einer Änderung der Hämodynamik. Es wird ein Umwandlungsprozess in Gang gesetzt, der sowohl den infarzierten Bereich, als auch den primär nicht geschädigten Teil der Herzmuskulatur betrifft. Dieser Vorgang wird als „Remodeling“ bezeichnet und ist charakterisiert durch eine progressive Dilatation, Hypertrophie, Veränderung der ventrikulären Kavitätenform von elliptisch zu kugelförmig und einer Verschlechterung der kontraktilem Funktion sowie durch Narbenbildung [13]. Der Prozess des Remodelings ist von der Lokalisation und Größe des Infarktes abhängig und dauert über Wochen und Monate an [14].

Der Prozess des Remodelings wird in eine frühe, innerhalb der ersten 72 Stunden nach dem Infarkt ablaufende, und eine sich anschließende späte Phase eingeteilt [13]. In der frühen Phase nach dem akuten Infarkt ereignis, noch vor der Resorption des nekrotischen Zellmaterials, kommt es zu einem extensiven Abbau des kollagenen Netzwerkes zwischen den Myozyten des infarzierten Gebietes und somit zu einer Steigerung der Dehnbarkeit des Gewebes [15-17]. Als Konsequenz folgt eine starke Ausdünnung und unter Umständen Elongation des infarzierten Bereiches. Diese so genannte Expansion des Infarktes wird durch das Auseinanderdriften von Muskelfaserbündeln auf Grund der Reduktion der Myozytenanzahl in der infarzierten Region ausgelöst [15-17]. Sie kommt vor allem bei großen transmuralen Infarkten vor, und es besteht anschließend ein erhöhtes Risiko, vital bedrohliche Komplikationen wie Aneurysmen oder Herzwandrupturen zu erleiden. Besonders groß

ist dieses Risiko bei großen, den Apex mit betreffenden, transmuralen anterioren Infarkten, weil sie zum einen die dünnste Wandstruktur als auch die größte Krümmung des Herzens betreffen.

Durch den Gewebsuntergang resultiert eine verminderte Auswurfleistung des Herzens. Die Abnahme der Ejektionsfraktion korreliert mit der Größe des Infarktes [18]. Durch die verminderte Auswurfleistung nimmt das endsystolische Volumen zu, und es bildet sich ein erhöhter enddiastolischer ventrikulärer Innendruck. Dies führt zu einer weiteren Dilatation des Ventrikels. Nach dem Gesetz von Laplace, welches besagt, dass die Wandspannung (= Kraft pro Wandquerschnitt) proportional mit dem Innendruck und dem Radius zunimmt, vergrößert die ventrikuläre Dilatation (= Radiusvergrößerung) die diastolische und systolische Wandspannung und stimuliert eine chronisch fortschreitende Dilatation [18-20].

Nach der Phase der Infarktexpansion folgt die lang andauernde Phase der Fibroblastenproliferation, Kollagensynthese und Narbenbildung. Außerdem beinhaltet diese Spätphase des linksventrikulären Remodelings Prozesse der Myozytenhypertrophie (eine bis zu 70%ige Zunahme des Zellvolumens) und Änderungen der Ventrikelarchitektur, was insgesamt zu einer günstigeren Verteilung der erhöhten Wandspannung führt [15]. Dieser Vorgang, der sowohl durch sezernierte Botenstoffe als auch durch die Dehnung der kardialen Zellen hervorgerufen wird, beschränkt sich nicht alleine auf die infarzierte Muskulatur des Herzens, sondern betrifft auch das noch intakte Myokard (*remote myocardium*) [15, 17]. Die plötzliche Änderung der systolischen und diastolischen Druckverhältnisse [14], die neurohormonale Aktivierung sowie lokale autokrine trophische Faktoren [21] bewirken eine Reexpression fetaler Gene, welche zu einer Synthese fetaler Proteine führen [21]. Die geänderte Genexpression führt zu einer veränderten Qualität und Quantität der extrazellulären Matrix [22]. Es kommt zu einer extensiven Proliferation von Fibroblasten und zur Anregung der Kollagensynthese. Dies führt zu einer diffusen interstitiellen, perivaskulären und fokal reparativen Fibrose [23, 24], die Myozyten des *remote myocardium* werden zur Hypertrophie angeregt [14, 21]. Sowohl während der akuten Phase des Myokardinfarktes, als auch in den Phasen des Remodelings können besonders in den Randzonen des Infarktes sowohl apoptotische als auch nekrotische Zellen nachgewiesen werden [25-27]. In den Infarkttrandbereichen konnte bis 60 Tage nach einem AMI ein Untergang von Kardiomyozyten durch Apoptose nachgewiesen werden [26]. Die Apoptoseraten in diesen Randbezirken werden in der Literatur mit sehr unterschiedlichen prozentualen Angaben (2% bis 12%) wiedergegeben, wobei als Einflussfaktoren die Zeitspanne zwischen dem Infarkt ereignis und der jeweiligen Untersuchung, die Infarktgröße, als auch der Rekanalisierungszustand der initial verschlossenen Koronararterie angegeben werden [27].

1.2 Apoptose

1.2.1 Mechanismen der Apoptose

Unter Apoptose wird ein hochgradig regulierter, biologischer Prozess des induzierten, intravitalem Zelltodes verstanden [6]. Apoptose ist die natürliche Form der Zellmauserung, die das

Gleichgewicht zwischen Zellvermehrung und Zellelimination ermöglicht und physiologischerweise während der Embryonalentwicklung auftritt. Außerdem spielt sie bei zahlreichen pathologischen Prozessen eine zentrale Rolle, wie beispielsweise bei der Elimination infizierter Zellen, bei Autoimmun- und degenerativen Erkrankungen etc. Die mikroskopischen Zeichen der Apoptose sind die Lösung der Zellen aus dem Zellverband, eine Zellschrumpfung, Bildung blasiger Protrusionen des Zytoplasmas, eine Verdichtung des Chromatins und Fragmentierung des Zellkerns sowie die Entstehung so genannter Apoptosekörperchen, welche entweder stark geschrumpfte Zellen oder deren Fragmente darstellen. Außerdem kommt es zu charakteristischen Veränderungen an der Zellmembran: es entstehen kleine Blasen (= blebs), es kommt zu einem Verlust der Mikrovilli und zur Exposition von Phosphatidylserin an der Außenseite der Zellmembran. Die Elimination apoptotischer Zellen erfolgt durch Phagozytose, wobei es hierbei - im Gegensatz zur Nekrose - nicht zu einer Entzündungsreaktion des umgebenden Gewebes kommt [27-29].

Die Induktion der Apoptose erfolgt über die Aktivierung einer Gruppe von aspartatspezifischen Cystein-Proteasen, den so genannten Caspasen (Übersicht in: [27, 30]). Sie sind Teil einer teilweise autokatalytischen, proteolytischen Kaskade. Caspasen finden sich in vitalen Zellen als inaktive Proformen im Zytosol, aktiviert werden sie durch proteolytische Spaltung. Aktivierte Caspasen spalten ihrerseits Substrate innerhalb der Zelle und bewirken eine Degradation des Zytoskeletts sowie nukleärer Proteine. Hierbei übernehmen die Caspasen 3, 6 und 7 die Spaltung von für die Zellfunktion essentiellen Schlüssel-molekülen. Sie werden daher als Exekutionscaspasen bezeichnet und bilden die gemeinsame Endstrecke der verschiedenen Signalwege. Im Rahmen der Apoptose-Kaskade werden auch Ca^{2+} -abhängige Endonukleasen aktiviert, die eine internukleosomale DNA-Spaltung hervorrufen. Diese Chromatin-Spaltung führt zunächst zu größeren (50-300 Kilobasen) und schließlich zu kleineren, 180-200 Basenpaar-Fragmenten. Die DNA-Fragmente ergeben bei der DNA-Elektrophorese, aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekülgröße und damit unterschiedlicher Wanderungstrecke im elektrischen Feld, ein charakteristisches Muster (*DNA-Laddering*).

Eine Technik zum Nachweis von apoptotischen Zellen in Gewebematerial ist die TUNEL-Färbung (*terminal deoxynucleotidyl transferase [TdT]-mediated deoxyuridinetriphosphat [dUTP] nick end-labeling*). Hier ermöglicht eine terminale Desoxynucleotidyltransferase die Markierung von DNA-Doppelstrangbrüchen, was später z.B. durch ein Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann. Weitere Nachweismethoden der Apoptose sind die Bindung von fluoreszenzmarkiertem Annexin V an Phosphatidylserin der Zelloberfläche und der Nachweis von aktivierten Caspasen [26, 31].

Bei der Initiierung der Apoptose sind zwei Hauptsignalwege bekannt, ein intrinsischer und ein extrinsischer Weg, welche letztendlich beide zu einer Aktivierung der Exekutionscaspasen führen. Mitochondrien spielen in dem intrinsischen Signalweg eine zentrale Rolle. Unterschiedliche Zellschädigungen, wie Hypoxie, Radikale, Toxine, Chemotherapeutika und Bestrahlung können eine Störung der normalen mitochondrialen Physiologie mit der Folge einer Änderung der

mitochondrialen Membranpermeabilität bewirken. Durch das Öffnen der *mitochondrial-permeability-transition-pore* (MPTP) oder Ruptur der äußeren mitochondrialen Membran gelangen Proteine aus dem intermembranösen Raum in das Zytosol. Freigesetzt werden so Cytochrom c, Smac/DIABLO, Endonuklease G (EndoG), Omim/Htr und *apoptosis-inducing factor* (AIF). Die Freisetzung von Cytochrom c ermöglicht im Zytoplasma die Ausbildung eines hochmolekularen Komplexes, dem Apoptosom, der sich aus Cytochrom c, Caspase 9 und dem Adapterprotein Apaf-1 (*apoptotic peptidase activating factor 1*) zusammensetzt. Die Apoptosomenbildung führt schließlich zur Aktivierung von Caspase 9, welche ihrerseits die Exekutionscaspase 3 aktiviert. Alternativ kann freigesetztes Smac/DIABLO Caspasen indirekt durch Sequestrierung von Caspase-Inhibitor-Proteinen aktivieren. Die Freisetzung von EndoG aus dem mitochondrialen intermembranösen Raum verursacht seine Translokation in den Zellkern. Dort ermöglicht es direkt oder indirekt die DNA-Fragmentierung [27].

Die extrinsische Signalkaskade wird über zellmembranständige Rezeptoren, die Mitglieder der *death-receptor*-Superfamilie, vermittelt. Zu ihnen zählen beispielsweise der Fas-Rezeptor/CD95 und der Tumor-Nekrose-Faktor α - ($\text{TNF}\alpha$ -) Rezeptor. Binden proapoptotische Liganden an die entsprechenden Rezeptoren, wird eine Rezeptorakkumulation und die Formierung des *death-inducing signaling complex* (DISC) ausgelöst. Dieser Komplex rekrutiert mehrere Procaspase 8-Moleküle über das Adaptermolekül *Fas-associated death domain protein* (FADD). Durch die unmittelbare Nähe zwischen dem DISC und den Procaspasen werden diese aktiviert. Die aktivierte Caspase 8 aktiviert ihrerseits die Exekutions-Caspase 3. Der extrinsische Apoptosesignalweg kann aber auch durch den Entzug spezifischer Hormone oder Wachstumsfaktoren ausgelöst werden. So führt beispielsweise ein Fehlen von Thyreotropin (TSH) bei Thyreozyten zu einer apoptotischen Degradation der Zellen [27].

Verbunden sind der intrinsische und der extrinsische Signalweg über die Caspase 8. Caspase 8 spaltet im Zytoplasma der Zellen das Molekül Bid (*BH3 domain-containing proapoptotic Bcl2 family member*), welches daraufhin in das Mitochondrium transloziert. Dort aktiviert es ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2-Superfamilie namens Bak und ermöglicht die Freisetzung von Cytochrom c [27].

Außer den beiden beschriebenen Signalwegen müssen allerdings noch weitere genetische Programme existieren, die zu einem apoptotischen Zelluntergang führen können. Bei Mäusen mit einem gleichzeitig bestehenden Defizit an Caspase 8 und 9, welche für die oben beschriebenen Signalwege essentiell sind, konnte dennoch ein Zelluntergang durch Apoptose nachgewiesen werden [32].

Ein weiterer Weg, der zum apoptotischen Untergang von Zellen führt, wird von Caspase 12 vermittelt. Caspase 12 ist im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und wird durch ER-Stress aktiviert. Unter bestimmten Umständen, wie zum Beispiel Glukoseverlust der Zelle oder Störung der zellulären Ca^{2+} -Homöostase, akkumulieren ungefaltete Proteine im ER-Lumen und

provozieren so ER-Stress. Daraufhin wird Caspase 12 aktiviert und in das Zytoplasma freigesetzt, wo es die Exekutionscaspase 3 aktiviert [27, 33].

Als eine der Hauptregulationskomponenten des apoptotischen Zelltodes hat sich die Bcl-2 Proteinfamilie herausgestellt. Sie besteht aus pro- (Bax und Bak) und antiapoptotischen (Bcl-2, Bcl-xL) Mitgliedern, welche entweder die Integrität der mitochondrialen Membran schützen oder sie zerstören und so die Freisetzung der proapoptotischen intermembranösen Proteine kontrollieren. Mitglieder einer weiteren Klasse von Todeseffektoren namens *BH3-only* wirken als Liganden, welche proapoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie aktivieren oder antiapoptotische inaktivieren können.

1.2.2 Apoptose im Herzen

Apoptose ist in die Pathologie zahlreicher Herzerkrankungen involviert. Wie bereits erwähnt, finden sich in den Randzonen eines Myokardinfarktes sowohl während der akuten als auch der chronischen Phase apoptotische Zellen (Übersicht in [26, 27]).

Die Exekutionscaspasen spalten in den Kardiomyozyten zahlreiche Proteine des Zytoskeletts wie α -Aktinin, α -Aktinin, Tropomyosin und kardiale Troponine. In den Myozyten wird die Apoptose meist über den intrinsischen Signalweg induziert. Stimuli hierfür sind Hypoxie, Reperfusion nach Ischämie und oxidativer Stress. Die Induktion der Apoptose kann aber auch über den extrinsischen Signalweg erfolgen. In adulten Kardiomyozyten finden sich Fas-Liganden, deren Menge in Abhängigkeit zu pathologischen Stimuli steigt [27]. Interessanterweise liegt der Blutspiegel von Fas-Liganden bei Menschen mit Herzinsuffizienz höher als bei gesunden Vergleichspersonen, was eine Aktivierung des Fas-Fas-Liganden-Systems widerspiegeln könnte [34]. In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass über die Verhinderung der Apoptose eine Abnahme der kardialen Dysfunktion und der Mortalität bei Herzinsuffizienz erreicht werden kann [25, 35-37].

Eine kardiale Überexpression von Fas-Liganden führt *in vitro* zu einer gesteigerten Apoptose [27]. Bei Lpr-Mäusen, die kein Fas exprimieren, konnten in Infarkt-Reperfusionen-Studien nach LAD-Verschluss weniger apoptotische Zellen und kleinere Infarktareale nachgewiesen werden [27, 38].

1.3 Experimentelle Ansätze zur Myokardprotektion

Der progrediente Verlust kontraktile Kardiomyozyten während eines akuten Myokardinfarktes, des Postinfarkt-Remodelings und in den chronischen Stadien der Herzinsuffizienz kann zunehmend die linksventrikuläre Funktion und die Krankheitsprognose der Patienten verschlechtern [26]. Aus diesem Grund werden seit einigen Jahren verschiedene Substanzen und Stoffe auf ihre kardioprotektive (u.a. auch antiapoptotische) Wirkung überprüft. Ziel ist es, Wirkstoffe zu finden, die protektiv auf Kardiomyozyten wirken, sie vor apoptotischem Untergang schützen und letztendlich dem Verlust an kontraktile Zellen entgegenwirken. Als ein diesbezüglich Erfolg versprechender Kandidat wurde zunächst beispielsweise *Insulin-Like Growth Factor -1* (IGF-1)

angesehen [39]. In einer Studie wurde Ratten in einem Ischämie-Reperfusionmodell eine Stunde vor Ischämieinduktion durch Koronararterien-Okklusion 1-10 μ g IGF-1 appliziert [40]. Das Ausmaß der myokardialen Schädigung wurde über einen Vergleich der Creatinin-Kinase- (CK-) Freisetzung im ungeschädigten *Septum interventriculare* und der infarzierten linksventrikulären Vorderwand (LVFW) bestimmt. Scheinoperierte Tiere ohne Myokardinfarkt, denen lediglich die Trägersubstanz appliziert wurde, zeigten keinen CK-Aktivitäts-Unterschied zwischen den beiden Herzregionen. Die mit IGF-1 behandelten Tiere wiesen im Vergleich zu ebenfalls infarzierten und reperfundierten Vergleichstieren, welche nur mit der Trägersubstanz behandelt wurden, eine signifikant geringere CK-Aktivitäts-Differenz in den untersuchten Herzregionen auf. Die Herzschädigung durch die Ischämie und die anschließende Reperfusion fiel hier geringer aus als in der nicht mit IGF-1 behandelten Vergleichsgruppe. Immunhistochemische Analysen des ischämischen, reperfundierten Gewebes zeigten einen ausgeprägten Anstieg von DNA-Fragmentation als Zeichen der Apoptose. IGF-1 senkte signifikant die Inzidenz der myokardialen Apoptose in diesem Modell. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass IGF-1 die Akkumulation neutrophiler Granulozyten in ischämischen Regionen während der Reperfusion hemmt. Diese Neutrophilen-Akkumulation wird als eine Hauptursache des Reperfusionsschadens angesehen [40].

In einer weiteren Studie zur kardioprotektiven Wirkung von IGF-1 wurden transgene Mäuse generiert, welche in ihren Kardiomyozyten IGF-1 β überexprimieren [39]. Diese Tiere zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen im Myokardinfarktmodell, dass die Überexpression von IGF-1 die Kardiomyozyten nach einem Infarkt vor dem Zelltod schützt und Remodeling-Vorgänge minimiert. Es wurde in dieser Versuchsreihe allerdings auch festgestellt, dass die Überexpression von IGF-1 zu einer Hypertrophie der Herzen führt. Daher scheint der theoretische Einsatz von IGF-1 für klinische Anwendungen limitiert zu sein.

Es wurde ebenfalls untersucht, inwieweit der Wachstumsfaktor *Transforming-Growth-Factor β* (TGF- β) den negativen Einflüssen von Tumor-Nekrose-Faktor α und den bei oxidativem Stress entstehenden freien Radikalen bei myokardieller Ischämie und Reperfusion entgegenwirken kann [40]. Es zeigte sich jedoch, dass TGF- β eine kardiale Fibrose sowie einen Zelluntergang von Kardiomyozyten durch Apoptose induziert [41]. Daher ist auch dieser Wachstumsfaktor für die klinische Anwendung eher nicht geeignet. Dennoch gibt es Hinweise darauf, dass andere Mitglieder der TGF-Superfamilie, die *Bone morphogenetic proteins* (BMP), möglicherweise über antiapoptotische Eigenschaften verfügen, ohne eine Hypertrophie oder Fibrose des Herzens auszulösen [42, 43].

1.4 Bone morphogenetic proteins

1.4.1 Familie der Bone morphogenetic proteins

Bone morphogenetic proteins (BMP) sind auto- und parakrin wirkende multifaktorielle Cytokine und werden der TGF- β -Superfamilie zugeordnet (Übersicht in [44]). Sie bilden innerhalb dieser Superfamilie die größte Untergruppe mit 14 von insgesamt 35 Mitgliedern [44-47]. Außer den BMPs werden noch TGF- β s, Säugetier-Aktivine und -Inhibine, *glia cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF), Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (GDFs), *Drosophila decapentaplegic*-Genprodukte (*dpp*), *Drosophila-gbb-60A*-Genprodukt, *Xenopus Vg1*-Genprodukte und *Müllerian inhibiting substance* (MIS) zu der TGF- β -Superfamilie gezählt [45-48].

Bone morphogenetic proteins wurden 1965 von Urist et.al [49] erstmalig beschrieben. Bei Nagern sind sie in der Lage, ektope Knochenbildung zu induzieren, weshalb sie den knochenwachstumstimulierenden Faktoren zugeordnet wurden [45, 50]. In den späten 1980er Jahren wurden mehrere BMPs aufgrund ihrer Fähigkeit, Knochen- und Knorpelwachstum zu stimulieren, isoliert und kloniert und konnten der Wachstumsfaktorfamilie TGF- β zugeordnet werden [45, 51].

Als knochenwachstumstimulierende Faktoren induzieren die *Bone morphogenetic proteins* auch in Zellen außerhalb osteogener Zelllinien die Aktivierung knochentypischer Enzyme. So kann die spezifische biologische Aktivität von BMPs über die Induktion solcher Enzyme bestimmt werden. Ein typisches, durch BMPs induziertes Enzym ist die Alkalische Phosphatase (AP). Der Nachweis der AP-Induktion unter dem Einfluss von BMPs hat sich als Aktivitätsnachweis der *Bone morphogenetic proteins* etabliert [52, 53].

BMPs sind jedoch auch in die Regulation von Wachstum, Differenzierung, Chemotaxis und Apoptose verschiedener Organe einbezogen [47, 54], und sie nehmen eine Schlüsselrolle im Knochenstoffwechsel und bei der Regulation von Reproduktionsvorgängen ein [44, 46]. Auch während der Embryogenese spielen BMPs eine wesentliche Rolle. So sind sie an der regelgerechten Entwicklung von Lunge, Haut, Intestinaltrakt, Zähnen und des Herzens beteiligt [55, 56].

Aufgrund der Aminosäuresequenz in ihrer terminalen Carboxyl-Signal-Region können die Mitglieder der BMP-Familie in verschiedene Untergruppen unterteilt werden, deren spezifische Funktionen zurzeit noch nicht vollständig geklärt sind. Insgesamt werden heute 14 BMP-Untergruppen unterschieden.

Bone morphogenetic proteins werden wie alle Mitglieder der TGF- β -Superfamilie als große Vorläufermoleküle mit einer aminoterminalen Signalsequenz (15 - 25 AS) und einer sogenannten Prodomäne variierender Größe synthetisiert, wobei die Signalsequenz für den sekretorischen Prozess und die Prodomäne für die Faltung, Dimerisierung und Regulation der Aktivität verantwortlich ist. Im Rahmen der Proteinreifung wird das Vorläufermolekül an einer bestimmten Sequenz (RXXX) geschnitten, so dass aus dem carboxy-terminalen Bereich ein C-terminales Peptid freigesetzt wird und so das reife Protein entsteht [47]. Das C-terminale Peptid beinhaltet die aktivitätsvermittelnde Region der Moleküle und weist 7 bis 9, für die TGF- β -Superfamilie charakteristische Cystein-Reste

auf [57]. Von diesen Cysteinresten liegen sechs als Gruppe vor und bilden über Disulfidbrücken einen charakteristischen „Cysteinknoten“. Das siebte Cystein ist für die Ausbildung einer weiteren Disulfidbrücke zwischen zwei BMP-Monomeren verantwortlich. Das durch dieses posttranskriptionale Processing entstandene Dimer ist nun biologisch aktiv und wird von den Zellen ausgeschüttet [44, 55].

1.4.2 Zelluläre Signaltransduktion

Die zelluläre Signaltransduktion der TGF- β -Superfamilie erfolgt über Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren. Werden diese durch Ligandenbindung aktiviert, phosphorylieren sie intrazellulär spezifische Smad-Proteine welche anschließend in den Zellkern translozieren. Dort aktivieren sie gemeinsam mit anderen Transkriptionsfaktoren die Genexpression spezifischer Zielgene [58, 59]. Die Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie werden in zwei Rezeptortypen unterteilt. Die TypI-Rezeptoren sind 50-55kDa große, in ihrem Grundzustand keilförmige Proteine. Sie bestehen aus einem extrazellulären Anteil mit einer Ligandenbindungsstelle, einer Transmembrandomäne und einem intrazellulären Anteil. Die Kinase-Domäne der Rezeptoren ist im Bereich des intrazellulären Anteils an einer als L45-Ring bezeichneten Struktur lokalisiert. Im inaktiven Zustand wird diese Domäne durch eine als GS-Domäne bezeichnete Region des Rezeptors blockiert. Benannt ist diese GS-Domäne nach der hier enthaltenen charakteristischen Glycin-Serin-Folge. Sie drückt gegen die Kinase-Domäne des Rezeptors und disloziert auf diesem Weg das katalytische Zentrum (Übersicht in [60-62]). Insgesamt existieren sieben verschiedene TypI-Rezeptoren bei Säugetieren [44], von denen drei BMP-Liganden binden: TypIA (BMPR-IA oder Alk-3), TypIB (BMPR-IB oder Alk-6) und TypIA-Aktivin-Rezeptor (ActR-IA oder Alk-2) [59, 63].

Die TypII-Rezeptoren sind 70-80 kDa große Proteine und bestehen ebenfalls aus einem extrazellulären, einem transmembranösen und einem intrazellulären Anteil. Die Ligandenbindungsstelle ist an der extrazellulären Domäne lokalisiert, der intrazelluläre Anteil beinhaltet die Kinase-Domäne. Wird der Rezeptor TypII durch Ligandenbindung oder Rekrutierung durch einen TypI-Rezeptor aktiviert, führt dies zur Phosphorylierung der GS-Domäne des TypI-Rezeptors und damit zu dessen Aktivierung [64]. Zurzeit sind fünf verschiedene TypII-Rezeptoren bekannt, von denen die folgenden drei BMPs als Liganden binden können: BMPR-II (BMP-Typ II-Rezeptor), ActR-II (Aktivin-TypII-Rezeptor), ActR-IIb (Aktivin-TypIIB-Rezeptor) [44].

Bei der weiteren Signaltransduktion nehmen Smad-Proteine eine zentrale Rolle ein. Es werden drei Untergruppen von Smad-Molekülen unterschieden. Smad-Proteine, die direkt mit den TypI-Rezeptoren in Interaktion treten, werden als *receptor-regulated-smads* (R-Smads) bezeichnet. Zu ihnen zählen Smad 1, 2, 3, 5 und 8. Über verschiedene Oberflächenstrukturen auf den Smad-Molekülen können diese durch einen aktivierten TypI-Rezeptor erkannt werden. Diese spezifische Identifikation der Smad-Moleküle ist von Bedeutung, da abhängig von der Ligandenbindung an die verschiedenen Rezeptoren unterschiedliche Smad Proteine phosphoryliert werden. Eine Bindung

von TGF- β bewirkt die Aktivierung von Smad 2 und 3, die Bindung von BMP-Molekülen induziert dagegen die Aktivierung von Smad 1, 5 oder 8 [54, 64-66].

Die zweite Gruppe der Smad-Moleküle wird durch Smad 4 repräsentiert, welches als Co-Smad (*common mediator smad*) bezeichnet wird. Co-Smads binden im Zytoplasma an aktivierte R-Smads. Der R-Smad-Co-Smad-Komplex wird in den Zellkern aufgenommen und beeinflusst dort die Regulation der Transkription [43, 64].

Die dritte Gruppe besteht aus inhibitorisch wirkenden Smad-Proteinen, den I-Smads. Zu dieser Gruppe gehören Smad 6 und Smad 7. I-Smads antagonisieren R-Smads und vermitteln einen negativen Feedback-Mechanismus des TGF- β -Signalweges. Smad 7 kommt im Zellkern vor und wird nach Aktivierung des TGF- β -Signalings in das Zytoplasma ausgeschleust, wo es die Phosphorylierung der R-Smads durch Bindung und Blockierung des aktivierten Rezeptors inhibiert [62, 67]. Smad 6 befindet sich im Zytoplasma und konkurriert mit dem Co-Smad 4 um die Bindung von phosphoryliertem Smad 1, welches durch diesen Vorgang inaktiviert wird [64].

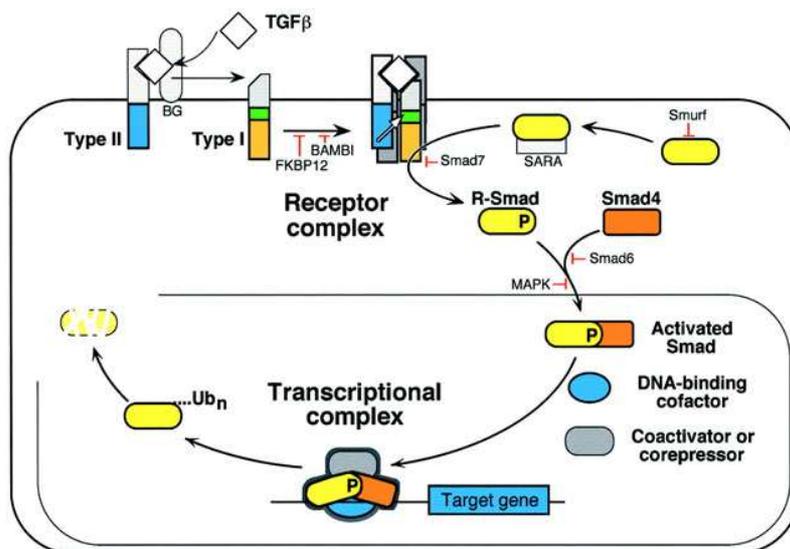


Abb.2: Signaltransduktion der TGF- β -Superfamilie (aus [67]).

Durch Bindung eines extrazellulären Liganden an den Rezeptor-TypII dimerisieren die beiden Rezeptoruntereinheiten. Anschließend werden durch die TypII-Untereinheit die Serin- und Threonin-Reste der TypI-Untereinheit innerhalb eines stark konservierten, in der Nähe der Membran lokalisierten Sequenzmotivs phosphoryliert, wodurch die Kinaseaktivität der Typ-I Untereinheit aktiviert wird. Die Signalübertragung in den Kern läuft über SMADs.

1.4.3 Intrazelluläre Signalkaskade

Die aktivierten R-Smads lösen sich aus der Bindung mit dem Rezeptor und bilden auf dem Weg Richtung Nucleus im Zytoplasma mit Smad 4 einen hetero-oligomeren Komplex. Die Anwesenheit des Co-Smads ist erforderlich, da viele Co-Aktivatoren, -Repressoren und Transkriptionsfaktoren nur durch den R-Smad/Co-Smad-Komplex rekrutiert werden können. Außerdem wird die Bindung

höchster Affinität an die DNA durch trimere Strukturen, bestehend aus einem Co-Smad und zwei R-Smads, vermittelt [67].

Die exakte Funktionsweise aktivierter Smad-Komplexe im Zellkern ist noch weitestgehend ungeklärt. Bekannt ist jedoch, dass der R-Smad/Co-Smad-Komplex im Zellkern mit anderen Transkriptionsfaktoren interagiert [42, 46, 47, 67-71].

Die Interaktion der MH1-Domäne der Smad-Proteine mit der DNA ist nicht selektiv. Alle Smad-Proteine erkennen die Konsensus-DNA-Sequenz CAGAC [72]. Die Bindung hat eine geringe Affinität, so dass Co-Faktoren eingebunden werden müssen, um eine feste und spezifische Bindung der Smad Proteine an den Zielgenen zu ermöglichen.

1.4.4 Regulationsmechanismen der BMP-Signaltransduktion

Die Regulation des BMP-Signalweges erfolgt auf verschiedenen Stufen (Übersicht in [44, 58]). Extrazellulär wird die Aktivität der BMPs durch zirkulierende Liganden-Bindungs-Proteine moduliert. Diese binden potentielle Liganden und bilden mit ihnen inaktive Komplexe, bevor die BMP-Moleküle mit den spezifischen Rezeptoren interagieren können. Als Moleküle mit dieser regulatorischen Funktion konnten zum Beispiel „Noggin“ und „Chordin“ identifiziert und isoliert werden. Beide binden mit hoher Affinität vor allem BMP2 und BMP4 [44].

Bei der Einstellung des extrazellulären BMP-Gradienten nehmen außerdem Antagonisten der Liganden-Bindungs-Proteine Einfluss. Es handelt sich hier um Metalloproteasen, welche Noggin und Chordin spalten und so deren Interaktion mit BMP-Molekülen verhindern. [67].

Die Regulation des BMP-Signalings auf Rezeptorebene erfolgt zum einen über akzessorische Rezeptoren, die die Bindung der BMPs an ihre Rezeptoren erleichtern, zum anderen existieren Faktoren, die eine Rezeptoraktivierung verhindern.

Der Pseudorezeptor „BMP- und Aktivin- membrangebundener Inhibitor“ (=BAMBI) ist ein Transmembranprotein, dessen extrazelluläre Domäne mit der von TypI-Rezeptoren weitgehend identisch ist. Der kurze intrazelluläre Anteil von BAMBI besitzt Ähnlichkeit mit dem katalytischen Anteil des TypI-Rezeptors, allerdings weist er kein katalytisches Zentrum zur Vermittlung intrazellulärer Signale auf. BAMBI konkurriert mit TypI-Rezeptoren um eine BMP-Bindung [44]. Außerdem behindert BAMBI die Signaltransduktion durch die Ausbildung von Heterodimeren mit TypI-Rezeptoren und verhindert auf diesem Wege ihre Aktivierung und die Signaltransduktion [73]. Ein zytosolisches Protein, mit dem Namen *FK506 binding protein-12* (FKBP12) inhibiert die Signaltransduktion der TypI-Rezeptoren. Es bindet an deren GS-Domäne und verhindert so die ligandenabhängige Phosphorylierung durch den TypII Rezeptor [44, 74]

Auch intrazellulär wird der BMP-Signalweg auf verschiedenen Ebenen kontrolliert. Die Ubiquitin-Ligase *Smad-ubiquitination-regulatory-factor-1* (=Smurf-1) besitzt eine Interaktionsdomäne, mit der sie Smad 1 und 5 erkennt und bindet, was zum Abbau der Smads führt. Außerdem bildet Smurf1 mit Smad6 einen Komplex und inhibiert BMP-TypI-Rezeptoren [46, 64, 75].

Wie bereits erwähnt, übernimmt eine Untergruppe der Smad-Proteine (die I-Smads) eine R-Smad antagonistische Funktion und vermittelt einen negativen Feedback-Mechanismus des Signalweges. Die beiden Vertreter dieser Gruppe sind Smad 6 und Smad 7. Smad 7 kommt im Zellkern vor und wird nach TGF β -Signaling in das Zytoplasma ausgeschleust, wo es die Phosphorylierung der R-Smads durch Blockierung des aktivierten Rezeptors inhibiert [62, 67]. Smad 6 befindet sich im Zytoplasma. Liegt ein hoher Smad 6 Zytoplasmaspiegel vor, bindet Smad 6 an BMP-Rezeptoren vom Typ I und verhindert die Aktivierung von Smad 1, 5 und 8 [44]. Weiterhin konkurriert es schon in niedrigen Konzentrationen mit dem Co-Smad 4 um die Bindung von phosphoryliertem Smad 1, welches durch diesen Vorgang inaktiviert wird. Eine Smad 4-Überexpression antagonisiert die Wirkung von Smad 6 und schützt so den BMP-Signalweg [64]. Liegt dagegen Smad 6 in höheren Konzentrationen vor, inhibiert es sowohl den TGF- β -, als auch den BMP-Signalweg [44, 64, 67]. Im Zellkern wird die Akkumulation der Smad-Proteine durch Ras-aktivierte Erk-Kinasen verhindert. Smad 1, 2 und 3 werden von den Proteinkinasen Erk1 und Erk2 an ihrer DNA-Bindungsregion phosphoryliert, was die DNA-Bindung verhindert und zum ubiquitinabhängigen Abbau der Smads führt. Einen auslösenden Faktor für diesen Vorgang stellt die Akkumulation von phosphoryliertem Smad 2 dar [64].

Die Regulation des BMP-Signalweges auf Transkriptionsebene erfolgt durch Inhibitoren der Smad-induzierten Transkription, zum Beispiel durch *Smad interacting protein 1* (SIP-1) [76]. SIP-1 ist ein *Zinkfinger-homedomain-Protein*, das Smad 1, 2, 3 und 5 binden und inaktivieren kann.

Auch das im Nucleus vorkommende Molekül Tob interagiert speziell mit aktivierten Smad Proteinen und verhindert die Transkription ihrer Zielgene [46, 64, 77]. Außerdem wird im Zellkern die Smad-induzierte Transkription durch Inhibitoren wie zum Beispiel TGIF, c Ski, and SnoN beeinflusst [64]. Die Inhibition des Smad-Signalweges ist in Abbildung 3 dargestellt.

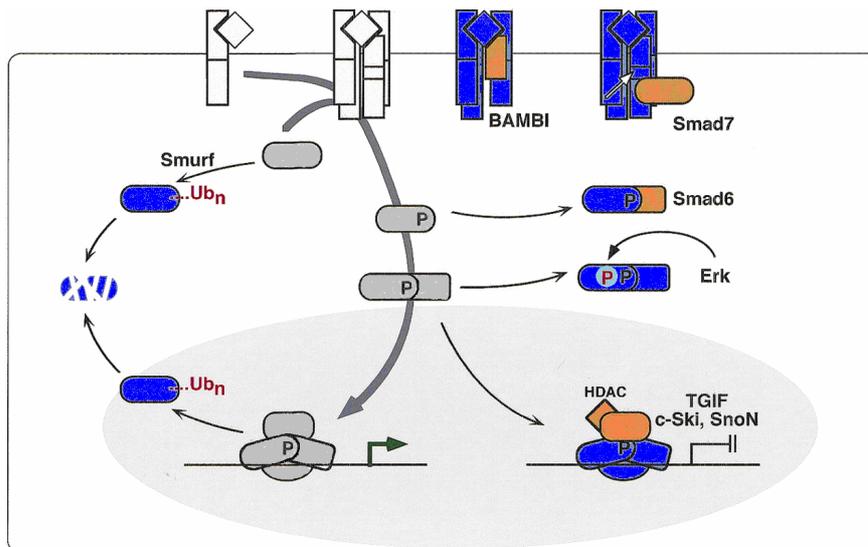


Abb.3.: Inhibition des Smad-Signalwegs (aus [[64]). Der Smad-Signalweg ist grau dargestellt, die Inhibitoren orange und die inhibierten Stadien blau.

1.4.5 BMP2

Bei BMP2 und dem nahe verwandten BMP4 handelt es sich um die homologen Proteine der Säugetiere zu *decapentaplegic* (dpp) der Taufliege *Drosophila melanogaster*. BMP2 und dpp weisen zu 75% identische Aminosäuresequenzen auf [45, 78, 79].

Dpp ist für die Körperschemaformation während der Embryonalentwicklung bei *Drosophila* verantwortlich, während BMP2 in myokardialen Vorläuferzellen in großen Mengen gebildet wird. Diese Entdeckung legte den Schluss nahe, dass BMP2 eine entscheidende Rolle bei der Herzentwicklung spielt. Um diesen Zusammenhang genauer zu eruieren, wurden BMP2-Knockout-Mäuse generiert [45]. Homozygote $BMP2^{-/-}$ -Embryonen weisen schwere Defekte in der Herz- und Amnion/Chorionentwicklung auf, die mit dem Leben nicht vereinbar sind, so dass diese Embryonen zwischen den Entwicklungstagen E7.0 und 10.5 sterben. Bei diesen Mäusen konnte zwar die Anlage des embryonalen Herzens in der extraembryonalen Amnionhöhle nachgewiesen werden, es entwickelte sich jedoch im Weiteren nur ein einfacher Herzschlauch, während bei gleichaltrigen Wildtypmäusen an Tag E9.5 bereits ein differenziertes Herz ausgebildet ist. Mit dieser Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass BMP2 während der embryonalen Herzentwicklung eine entscheidende Rolle spielt und dass ohne BMP2 ist die Ausbildung eines funktionsfähigen Herzens nicht möglich ist [45, 68, 80-83].

In Zellkulturversuchen wurde für BMP2 eine große Anzahl unterschiedlicher Wirkungen nachgewiesen. BMP2 induziert die Differenzierung mesenchymaler Zellen zu osteoblastischen oder knorpelbildenden Zellen [54] und stimuliert die Kollagensynthese [84]. Weitere Studien beschreiben, dass die Gabe von BMP2 die Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten induziert [42, 81, 85, 86], während eine Überexpression des inhibitorischen Smad 6 die kardiomyozytäre Differenzierung verhindert [43]. Eine Schlüsselfunktion der kardialen

Morphogenese ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nkx 2.5, da dieser Transkriptionsfaktor die frühe kardiale Genexpression reguliert [43]. Die Zugabe von BMP2 und TGF- β in das Nährmedium von Zellkulturen undifferenzierter Stammzellen bewirkt einen signifikanten Anstieg der m-RNA von Nkx 2-5 und MEF2C als Marker der kardialen Differenzierung [86]. Auch weisen embryonale Stammzellen nach Behandlung mit BMP2 und TGF- β signifikant höhere Anteile an Myofibrillen auf [86]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Gabe von BMP2 die Apoptose von neonatalen Kardiomyozyten nach Serumentzug durch die Induktion von Bcl-xL zu verhindern vermag [43].

In adulten Herzmuskelzellen wurden bislang nur wenige BMP-Effekte analysiert. Unlängst konnte aber gezeigt werden, dass der Zusatz von BMP2 zu adulten Kardiomyozyten die Aktivität der Phosphoinositol 3-Kinase (PI-3 Kinase) erhöht und die fraktionelle Verkürzung der Herzmuskelzellen steigert [56]. Auch konnte nachgewiesen werden, dass mesenchymale Stammzellen von Fisher-344-Ratten unter dem Zusatz eines Wachstumsfaktorgemisches, bestehend aus *Fibroblasten-growth-factor* (FGF), *Insulin-like-growth-factor1* (IGF1) und BMP2, vermehrt kardiale Transkriptionsfaktoren exprimieren. Wurden diese vorbehandelten Zellen gemeinsam mit Kardiomyozyten co-kultiviert, konnte zum einen ein Anstieg der *Gap junctions* zwischen den Zellen nachgewiesen werden, zum anderen gingen in der Kultur unter Hypoxiebedingungen deutlich weniger benachbart wachsende Kardiomyozyten durch Apoptose zugrunde als in den Vergleichskulturen. In einem Myokardinfarktmodell bei Ratten führte die Transplantation der vorbehandelten Zellen zu einer Reduktion der Infarktgröße sowie einer verbesserten Herzfunktion im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, der unbehandelte Zellen transplantiert wurden [87].

Klinische Untersuchungen haben bislang zeigen können, dass sich BMP2 für unterschiedliche therapeutische Interventionen am Skelettsystem eignet. BMP2 wurde bereits mehrfach bei der Behandlung von Knochendefekten, Osteoporose, Wurzelkanal-Operationen und spinaler Fusion erfolgreich eingesetzt [46]. Seit 2001 stehen sowohl BMP2 (InductOS®, Diboterminalfa®) als auch BMP7 (Osigraft®) als gentechnologisch hergestellte Medikamente zur Verfügung. BMP2 ist bei offenen Unterschenkelfrakturen, BMP7 bei Pseudarthrosen an der Tibia indiziert und zugelassen. Sehr erfolgreich ist der Einsatz der BMPs als aufgeladene Spongiosaplastik bei Pseudarthrosen [88].

2. Zielstellung

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, inwiefern die Gabe von BMP2 bei Kardiomyozyten unter Stressbedingungen protektive Wirkungen entfaltet. Um diese Fragestellung zu klären, wird analysiert, ob die Gabe von BMP2 zu positiven Auswirkungen in einem Herzinfarktmodell bei Mäusen führt. Weiterhin wird in Zellkulturexperimenten untersucht, welchen Einfluss die Applikation von BMP2 auf das Überleben und die Apoptoserate adulter Kardiomyozyten bei oxidativem Stress bzw. unter Hypoxie hat. Es wird untersucht, ob BMP2 die Schlagfrequenz und Kontraktilität von isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten beeinflusst.

3. Material und Methoden

3.1 Herstellung des BMP2 und Nachweis der biologischen Aktivität

Das in dieser Arbeit verwendete BMP2 wurde freundlicherweise von Frau Dr. Schwarz, Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, zur Verfügung gestellt. Die Herstellung des BMP2 wurde bereits ausführlich beschrieben [89].

Mittels PCR wurde die kodierende Sequenz von BMP2 kloniert, der Vektor pET11a (Novagen) wurde zur Expression der cDNA in *Escherichia coli* verwendet. Die Isolierung und Renaturierung von BMP2 erfolgte über bakterielle Einschlusskörper (*inclusion bodies*, IB). Hierbei wurden zunächst die IB-Proteine in 5M Guanidium-Chlorid gelöst und anschließend in Puffer (0,1M TrisHCl, 1M L-Arginin, 5mM EDTA, 5mM oxidiertes Glutathion und 2mM reduziertes Glutathion) 1:100 verdünnt. Nach der Renaturierung (3 bis 14 Tage) wurde BMP2 durch die Verwendung einer Filtron-Minisetten-cross-flow-Apparatur (Pal Gelman) aufkonzentriert, anschließend wurde der pH-Wert auf 5,5 eingestellt und die Lösung gegen 0,1M Tris, 75mM Essigsäure, 0,2M KH_2PO_4 , 5mM EDTA und 6M Harnstoff dialysiert und danach filtriert. Abschließend wurden 30mg BMP2 auf eine HiTrapTM Heparin-Sepharose-HP-Säule aufgetragen. Nach mehrfachem Waschen erfolgte die Elution mittels NaCl-Lösung.

Bevor das BMP2 in den Experimenten eingesetzt wurde, erfolgte zunächst der Nachweis der biologischen Aktivität anhand der Induktion des Enzyms Alkalische Phosphatase in Fibroblasten (NIH3T3) [52, 53]. Hierzu werden NIH 3T3 Fibroblasten in einer Dichte von 10^4 Zellen pro Well in 96-Well-Mikrotiter-Platten aufgetragen und in 200 μl DMEM Medium über Nacht bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wird dem Medium BMP2 in verschiedenen Konzentrationen (0ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml und 200ng/ml) hinzugefügt und die Zellen inkubieren in diesem Medium bei 37°C über einen Zeitraum von zwei Tagen. Anschließend wird das Medium von den 96well Platten abgesaugt und die Zellen mit 200 μl PBS einmal gewaschen. Dann werden 50 μl Wasser pro Well hinzugeben und die Platte dreimal auf Trockeneis gefroren und bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. Nun werden 50 μl Assay-Mix (50 mM Glycine-Puffer pH 10,3, 0,05% Triton X-100, 4mM MgCl_2 , 5mM p-Nitrophenolphosphat) pro Well aufgetragen und wirken für 2-3 Stunden bei 37°C ein. Anschließend wird die Absorbanz bei 405nm gemessen.

3.2 In vivo-Untersuchungen

3.2.1 Mäuse

Die Versuche werden an adulten weiblichen ICR-Mäusen mit einem Mindestgewicht von 30g durchgeführt. Bezogen werden die Tiere von dem Züchter Harlan-Winkelmann.

Die Mäuse haben freien Zugang zu Wasser und Futter (ALTRONIN Standard-Diät 1320) und sind einem Hell-Dunkel-Wechsel alle 12 Stunden ausgesetzt. Die Lichtphase beginnt morgens um 6 Uhr.

Die Kennzeichnung aller Tiere erfolgt durch Setzen von Ohrmarkierungen unter Narkose, so dass eine eindeutige Identifizierung jedes einzelnen Tieres möglich ist. Alle Tiere werden einmal pro Woche gewogen.

3.2.2 Herzinfarktmodell

30 Minuten vor der geplanten Infarzierung des Herzens werden den Mäusen unter 2,5% Isofluran–Inhalationsnarkose entweder 80ng/g KG BMP2 gelöst in PBS oder nur die Trägersubstanz PBS intravenös retrobulbär injiziert, wobei dem Experimentator jedoch der Inhalt der jeweiligen Lösung unbekannt ist.

Die Mäuse werden unter 2,5% Isofluran–Inhalationsnarkose orotracheal intubiert und an ein Beatmungsgerät (MiniVent, Hugo Sachs Elektronik) angeschlossen. Die Beatmung und gleichzeitige Aufrechterhaltung der Narkose erfolgt mit 2,5% Isofluran in O₂. Die Mäuse werden mit einem positiven Druck volumenkontrolliert beatmet (IPPV). Vor Beginn der Operation werden einmalig 5µg/g KG Rimadyl als Analgetikum subcutan verabreicht.

Die Ligatur der LAD erfolgt, wie es in der Literatur beschrieben ist [90-92]. Im narkotisierten Zustand werden die Tiere über dem linksseitigen Thorax rasiert. Präoperativ wird das Operationsfeld desinfiziert. Anschließend wird ein Hautschnitt parallel des Rippenverlaufes in Höhe des vierten Interkostalraumes gesetzt. Die den Thorax bedeckende Muskulatur (*Musculus pectoralis major et minor*) wird sorgfältig freigelegt. Vorsichtig werden die Muskeln einzeln mit einem 5-0 Faden umlegt und durch leichte Zugkraft separiert. Nun wird der Thorax über einen interkostalen Zugang im vierten Zwischenrippenraum auf der linken Seite eröffnet. Hierzu werden die *Musculi intercostales* des vierten Zwischenrippenraumes durchtrennt. Anschließend wird die Lunge vorsichtig beiseite geschoben und das Perikard eröffnet. Das Herz wird freigelegt und das linke Herzkranzgefäß (LAD) proximal seiner Hauptaufzweigung durch eine Ligatur unterbunden. Die Ligatur war erfolgreich, wenn die anteriore Wand des linken Ventrikels sich blass verfärbt, die Kontraktilität abnimmt und die LAD eine livide Färbung annimmt.

Die Wunde wird in drei Schichten vernäht. Begonnen wird mit der Adaptation der Rippen, es folgt die Adaptation der separierten Muskulatur, zuletzt wird die Haut geschlossen. Anschließend werden die Mäuse extubiert und wieder in einen Käfig gesetzt, in dem sie unter Aufsicht zu Bewusstsein kommen.

Scheinoperierte Mäuse werden identisch behandelt, mit dem Unterschied, dass keine Ligatur der linken Koronararterie vorgenommen wird.

Postoperativ wird dem Trinkwasser der Tiere drei Tage lang Rimadyl als Analgetikum in einer Konzentration von 50mg/l beigelegt. Im Anschluss an die Operation werden die Mäuse einmal wöchentlich gewogen.

3.2.3 Echokardiographie

Unter 1,5% Isofluran–Inhalationsnarkose und Spontanatmung wird bei den Mäusen die Echokardiographie durchgeführt.

Von den Tieren werden sowohl präoperativ als auch 21 Tage nach dem LAD-Verschluss anhand von Ultraschallaufnahmen des Herzens (PowerVision, Toshiba; Sektorsonde 10 MHz) in der parasternalen kurzen Achse folgende Variablen gemessen:

Im M-Mode werden der linksventrikuläre Innendiameter enddiastolisch (LVIDD) und systolisch (LVIDS), die Ejektions-Fraktion nach Teichholz (EF) und die fraktionelle systolische Durchmesserverkürzung (*shortening Fraction*, FS) bestimmt. Die ermittelte fraktionelle systolische Durchmesserverkürzung (FS) berechnet sich dabei wie folgt:

$$FS = \frac{(LVIDD - LVIDS)}{LVIDD}$$

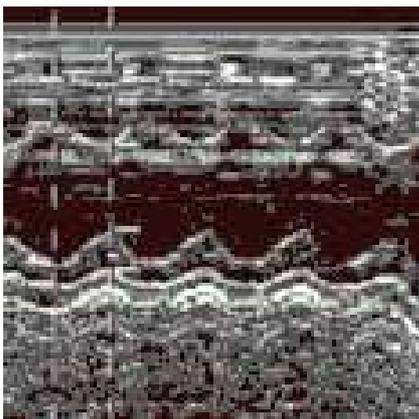


Abb.4: M-Mode Echokardiographie. Aufnahme in der parasternalen kurzen Achse vor LAD-Verschluss

Im B-Mode wird die Fläche des linken Ventrikels durch manuelles Umfahren der Endokardlinie mit dem Cursor markiert und ausgemessen. Auf diese Weise werden die diastolische endokardiale Fläche und die systolische endokardiale Fläche bestimmt. Diese Flächenangaben werden benötigt, um die systolische Verkleinerung der linksventrikulären Fläche im Kurzachsen-Schnitt (=fraction of area change, FAC), einen weiteren Parameter zur Beschreibung der Pumpfunktion des linken Ventrikels, zu berechnen.

Die FAC [%] wird wie folgt ermittelt:

$$FAC [\%] = \frac{(\text{Area diast.} - \text{Area syst.})}{\text{Area diast.}} \times 100$$

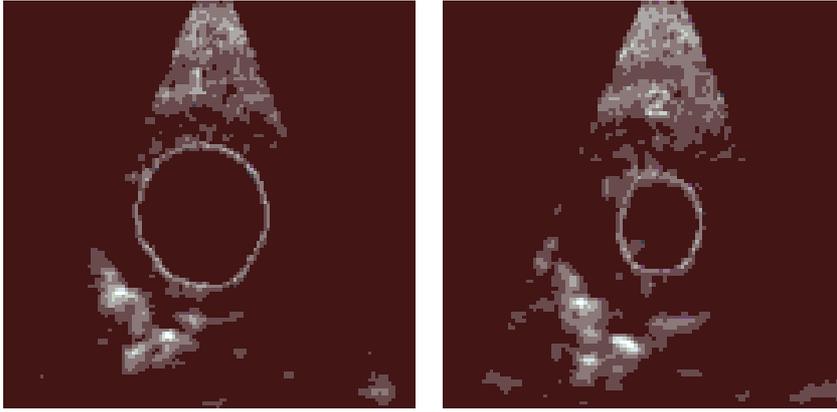


Abb.5: B-Mode Echokardiographie. Aufnahmen eines Herzzyklus in der parasternalen kurzen Achse vor LAD-Verschluss, markierte Endokardkontour des linken Ventrikels in der Diastole (links) sowie in der Systole (rechts).

3.2.4 Fixation und Präparateherstellung

21 Tage nach dem LAD-Verschluss werden die Mäuse erneut mit 2,5% Isofluran narkotisiert. Die Tiere erhalten einen Trachealtubus und werden maschinell beatmet (siehe 3.2.2.). Nun wird der Bauchraum vorsichtig eröffnet und das Zwerchfell dargestellt, ohne größere Blutungen zu verursachen. Unter Sicht wird das Zwerchfell vorsichtig links parasternal perforiert und anschließend der Brustraum ohne Verletzung des Herzens und der Lunge über die Durchtrennung der Rippen eröffnet. Zur exakten Bestimmung der histomorphologischen Parameter erfolgt die Entnahme des Herzens erst nach diastolischer *in-situ*-Fixierung. Hierzu wird in den LV-Apex eine Kanüle eingeführt. Das rechte Herzohr wird resiziert, um einen Abfluss der zugeführten Flüssigkeiten nach der Kreislaufdurchspülung zu ermöglichen. Über die LV-Kanüle wird das Herz und der Kreislauf zunächst mit 50ml einer kardioplegen KCL-Heparin-Lösung (50mM KCL + 200IE/ml Heparin in PBS) durchspült. Anschließend wird über den gleichen Zugang das Gewebe mit 50ml 4% PFA fixiert.

Entnommen werden das Herz, die Lunge, die Leber, ein Stück des Zwerchfells und die Tibia. Das Herz wird aus dem umgebenden Gewebe gelöst, und die zuführenden und abgehenden Gefäße werden durchtrennt, so dass das Herz aus dem Brustraum entnommen werden kann. Anschließend wird die komplette Lunge entnommen und rückseitig sorgfältig die Verbindung zwischen Trachea und Ösophagus gelöst. Die Leber wird unter dem Erhalt aller Leberlappen aus dem Bauchraum herauspräpariert, und ein Stück des Zwerchfells wird entnommen. Zunächst werden die Organe gewogen, und die Länge der Tibia wird mittels Lineal ausgemessen. Über Nacht werden die Lunge, die Leber, das Zwerchfell und das Herz in 30% Saccharose in PBS gelegt. Das Einbetten der Organe erfolgt zur Vorbereitung auf die histologische Aufarbeitung am nächsten Tag mit Polyfreeze™ Tissue Freezing Medium™ (Polyscience, Inc.). Hierbei wird streng auf die räumliche Orientierung der Herzen geachtet: es wird sichergestellt, dass bei der späteren Anfertigung der Kryoschnitte jeweils Kurzachsenschnitte (vom Apex zur Herzbasis) resultieren. Bei -20°C werden die

eingebetteten Organe aufbewahrt, bis sie in einem Gelfrierschnittkryotom geschnitten und auf Objektträger aufgezogen werden.

3.2.5 Herstellung der Schnittpräparate

Zunächst werden nach den Angaben des Herstellers die Objektträger mit Vectabond beschichtet [VECTOR Laboratories, Burlingame, CA 94010, USA]. Die Schnittpräparate werden mit einem Gelfrierschnittkryotom (MICROM, HM 500 OM, **Microm Laborgeräte GmbH**, Walldorf, Deutschland) angefertigt.

Um später eine eindeutige Rekonstruktion der Herzen anhand der histologischen Schnitte zu ermöglichen, werden alle Herzen jeweils vollständig (d.h. von Apex bis Basis) nach einem standardisierten Vorgehen aufgearbeitet. Hierbei wird die Schnittdicke auf 25µm eingestellt und 24 Schnitte dieser Dicke hergestellt. Pro Objektträger werden dabei vier Schnitte aufgezogen. Nach diesen 24 Schnitten wird die Schnittdicke auf 10µm reduziert, und es werden 12 Präparate dieser Dicke hergestellt, wobei jeweils drei Gewebeschnitte auf einem Objektträger platziert werden. Anschließend wird das Kryotom erneut auf eine Schnittdicke von 25µm umgestellt und der beschriebene Zyklus wird wiederholt. Auf diese Weise wird fortgefahren, bis das gesamte Präparat geschnitten ist.

Die Präparate von Lunge, Leber und Zwerchfell werden nur teilweise histologisch aufgearbeitet (im Sinne von jeweils einer Stichprobe pro Organ), hierbei werden durchgehend Schnitte in einer Dicke von 10µm angefertigt.

Alle Schnitte werden sofort nach ihrer Anfertigung auf beschichtete Objektträger aufgezogen und bei Raumtemperatur mindestens eine halbe Stunde getrocknet. Bis zu ihrer weiteren Bearbeitung werden sie dann bei -20°C gelagert.

3.2.6 Trichrom-Färbung der Präparate und Infarktgrößenbestimmung

Um für die Auswertung der Infarktgrößen vergleichbare Schnitte der selben Ebenen bei allen Herzen zu erhalten, werden den Präparaten zunächst anhand ungefärbter Schnitte die Objektträger bestimmt, an denen das erste Mal der Apex bzw. der Mitralklappenring angeschnitten sind. Hieraus werden nun die vier Schnitte berechnet, die den linken Ventrikel in fünf gleiche Abschnitte teilen. Die Objektträger, die diese vier Schnitte enthalten, werden für die Trichromfärbung verwendet (Kit der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Germany).

Nach den Angaben des Herstellers werden die Objektträger mit den 25µm dicken Schnittpräparaten zunächst zwei mal 15 Minuten in PBS-Lösung gewaschen. Nun werden die Objektträger für 15 Minuten bei 56°C in *Bouin's Solution* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Germany) im Brutschrank fixiert. Anschließend werden die Objektträger unter laufendem Wasser so lange gespült, bis keine gelben Farbwolken mehr zu sehen sind. Die Objektträger werden in deionisiertes Wasser eingetaucht und anschließend fünf Minuten lang in *Bieberich Scarlet-Acid-Fucsin* gefärbt.

Hiernach werden die Objektträger erneut in deionisiertes Wasser getaucht und nachfolgend fünf Minuten in *Phosphotungstic/Phosphomolybdic Acid Solution* gefärbt. Die *Phosphotungstic/Phosphomolybdic Acid Solution* wird kurz zuvor bei Raumtemperatur frisch hergestellt aus 50ml *Phosphotungstic Acid*, 50ml *Phosphomolybdic Acid* und 100ml deionisiertem Wasser. Der nächste Färbeschritt ist das Baden der Schnitte in *Aniline Blue Solution* für weitere fünf Minuten. Anschließend werden die Objektträger zwei Minuten in 1%ige Essigsäure gestellt. Schließlich folgt die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und in Xylol. Die Präparate werden mit Entellan und einem Deckgläschen abgedeckt, unter dem Mikroskop betrachtet und fotografiert.

Die auf die gleiche Weise behandelten Schnittpräparate von Lunge, Leber und Zwerchfell werden unter dem Lichtmikroskop auf mikroskopisch sichtbare Veränderungen hin untersucht.

Für die Bestimmung der Infarktgröße werden die digitalen Fotos der Herzschnitte in dem Programm „Adobe Photoshop 7.2“ in eine geeignete Bildgröße und Auflösung formatiert, um in einem weiteren Schritt mit dem Programm „Scion Image“ die Herzen und die Infarkte ausmessen zu können.

In dem Programm „Scion Image“ können manuell mit dem Maus-Cursor des Computers Strecken abgefahren und hierbei vermessen werden. Für die Bestimmung der Infarktgrößen wird mit dem Cursor zunächst manuell die Endokardkontour und die Perikardkontour des linken Ventrikels abgefahren und die sich ergebenden Strecken gemessen. Anschließend wird auf gleiche Weise die Länge des infarzierten Segmentes sowohl endokardial als auch perikardial bestimmt. Diese Daten werden bei jedem Herz für die vier zuvor ausgesuchten Schnitte (siehe oben) ermittelt, so dass dann mit folgender Formel die Infarktgröße jeweils exakt bestimmt werden kann:

$$\text{Infarktgröße} = \frac{(\sum \text{LV endokardiale Infarktlänge} + \sum \text{LV perikardiale Infarktlänge})}{(\sum \text{LV ges. endokardiale Cirkumferenz} + \sum \text{ges. perikardiale Cirkumferenz})}$$

3.2.7 Bestimmung der Myozytenquerschnittsflächen (MCSA)

Pro Herz werden für die Bestimmung der Myozytenquerschnittsflächen (MCSA) jeweils zwei Objektträger mit 10µm Schnittpräparaten verwendet, es wird hierfür ein bereits zuvor ausführlich beschriebenes Verfahren genutzt [93]. Die Objektträger werden zweimal jeweils 15 Minuten in PBS gewaschen und anschließend 20 Minuten in 4% PFA nachfixiert. Für die Färbung der Myozytenmembranen müssen die Präparate für fünf Minuten mit PBS pH 7,4 und danach einmal mit PBS pH 5,0 gewaschen werden. Dann wird Neuraminidase in einer Konzentration von 3,3U/ml aufgetragen und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss werden die Objektträger zweimal mit PBS gespült. Fluorescein-konjugiertes Peanut Agglutinin [VECTOR Laboratories, Burlingame,

CA 94010, USA] wird in einer Konzentration von 5mg/ml aufgetragen und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend werden die Schnitte dreimal mit PBS abgespült.

Um nun noch die Zellkerne der Myozyten darzustellen, wird mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Hoechst 33258 [Molecular Probes, Inc., Eugene, USA] in einer Konzentration von 5µg/ml für zehn Minuten bei Raumtemperatur gegengefärbt. Im Anschluss wird der überschüssige Farbstoff durch dreimaliges Spülen mit PBS entfernt. Abschliessend wird mit Mowiol (s. 3.4) eingedeckelt und die Präparate über Nacht lichtgeschützt im Kühlschrank gelagert.

Am nächsten Tag erfolgt die Auswertung unter dem Laser-Scan-Mikroskop (LEICA DM IRE2, Typ: TCS SP-2; Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Germany). Bei 360facher Vergrößerung wird im Bereich des *Septum interventriculare* des Herzens eine Stelle aufgesucht, in der möglichst viele Kardiomyozyten im Querschnitt angeschnitten sind. Von dieser Stelle werden jeweils immer die Fluoreszenz der Zellkerne (Hoechst 33258) und die des angefärbten Kollagens (Peanut-Agglutinin) aufgenommen.

Für die Auswertung werden die Bilder in dem Programm „Adobe Photoshop 7.2“ auf eine geeignete Bildgröße und Auflösung formatiert und die beiden Fotos derselben Lokalisation (die Darstellung des Kollagens und der Zellkerne) übereinander gelegt, so dass nun die Zellkerne in den entsprechenden Herzmuskelzellen sichtbar sind. Anschließend werden mit dem Programm *Scion Image* die Kardiomyozyten ausgemessen, in denen ein Zellkern sichtbar ist. Da bei Kardiomyozyten die Zellkerne zentral in den Zellen liegen, können so die Myozyten-Durchmesser einheitlich etwa im Bereich der Zellmitte bestimmt werden. Die Messung der Myozytengrößen erfolgt durch manuelles Umfahren der Zellen mit dem Maus-Cursor.

3.2.8 Bestimmung der interstitiellen Kollagen-Fraktion (ICF)

Für die Bestimmung der interstitiellen Kollagen-Fraktion (ICF) werden pro Herz zwei Objektträger der 10µm dicken Schnittpräparate verwendet, es wird hierfür ein bereits zuvor ausführlich beschriebenes Verfahren genutzt [93]. Da bei der Anfärbung des Kollagens durch Fluorescein-Peanut-Agglutinin (siehe 3.2.7.) auch der Kollagenanteil der im Herzmuskel verlaufenden Gefäße mit angefärbt wird, ist zur exakten Ermittlung der interstitiellen Kollagen-Fraktion ein weiterer Schritt notwendig, in dem die zwischen den Myozyten gelegenen Kapillaren separat angefärbt werden, um später aus der Differenz des Gesamt-Kollagens (angefärbt durch Fluorescein-Peanut-Agglutinin) und des Gefäß-Kollagens (visualisiert durch Rhodamine-Griffonia Simplicifolia Lectin-I) das interstitielle Kollagen bestimmen zu können. Da eine Simultanfärbung von Gesamtkollagen und Gefäßen nicht mit ausreichender Qualität möglich ist, werden für die Darstellung der Kapillaren diejenigen Objektträger verwendet, die den zuvor bereits für die Fluorescein-Peanut-Agglutinin-Färbung verwendeten direkt benachbart sind.

Zunächst werden die Präparate zweimal für 15min. mit PBS gewaschen und im Anschluss über 30min. mit PFA nachfixiert. Überschüssiges PFA wird dann durch viermaliges fünfminütiges

waschen mit PBS entfernt. Danach wird Rhodamine-Griffonia Simplicifolia Lectin-I (GSL I; VECTOR Laboratories, Burlingame, USA) in einer Verdünnung von 1:400 aufgetragen und zwei Stunden lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wird der überschüssige Farbstoff durch dreimaliges Spülen mit PBS entfernt. Nun wird das Präparat mit Mowiol eingedeckelt und über Nacht lichtgeschützt im Kühlschrank gelagert.

Am nächsten Tag erfolgt die Auswertung der Präparate unter dem Laser-Scan-Mikroskop (LEICA DM IRE2, Typ: TCS SP-2). Hierzu wird bei 360facher Vergrößerung im Bereich des *Septum interventriculare* des Herzens eine Stelle aufgesucht, in der möglichst viele Kardiomyozyten im Querschnitt angeschnitten sind. Von jedem Schnitt werden zehn Bilder angefertigt, die Kapillarmenge anhand der Fluoreszenz-Intensität mit Hilfe eines standardisierten Vorgehens mit dem Programm Scion Image bestimmt und schließlich die Mittelwerte miteinander verrechnet. Die interstitielle Kollagen-Fraktion entspricht der mittleren Kollagenmenge des mit Fluorescein-Peanut-Agglutinin dargestellten Gesamt-Kollagens abzüglich der anhand der Rhodamine-GSL1 bestimmten mittleren Kapillarmenge (als Maß des Gefäßwandkollagens).

3.3 Zellkultur

3.3.1 Zellpräparation

Adulte Rattenkardiomyozyten

Adulte Rattenkardiomyozyten wurden freundlicherweise von Frau Dr. Hoffmann-Heinroth aus dem Institut für Pharmakologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zu Verfügung gestellt [94].

Die Präparation der Kardiomyozyten erfolgt mit Hilfe einer Langendorff-Perfusionsapparatur, diese dient zur Isolierung von Myozyten aus Myokardgewebe. Das entnommene Herz wird an ein System angeschlossen, welches eine gleichmäßige Perfusion der Koronarien mit einer proteolytischen Lösung (Kollagenase) sichert, so daß es zu einer langsamen Auflösung der interzellulären Verbindungen des Herzmuskelgewebes kommt. Die Präparation besteht aus drei Schritten. Zunächst erfolgt die Perfusion des Herzens, dann die Dispersion des Gewebes und schließlich die Anreicherung der stäbchenförmigen Myozyten.

Vor der Entnahme der Herzen werden zwei Ratten mit je 50mg/kg Pentobarbital-Lösung intraperitoneal (i.p.) narkotisiert, anschließend werden den Tieren jeweils 5000 IE/kg Heparin i.p. verabreicht. Die Tiere erhalten einen Trachealtubus und werden maschinell beatmet. Nun wird der Brustraum nach Rasur und Desinfektion der Haut über eine mediale Sternotomie eröffnet. Um den Aortenbogen wird ein Faden gelegt und locker einfach verknotet, der Knoten wird mit einer Klemme fixiert. Anschließend wird die untere *Aorta thoracica* durchtrennt, das Herz vorsichtig aus dem umgebenden Gewebe gelöst und der Aortenbogen in Höhe des Abganges der *Arteria carotis communis sinistra* durchschnitten. Das Herz wird entnommen und in eiskalte, begaste physiologische NaCl-Lösung gelegt. Das zweite Herz wird auf gleiche Weise entnommen.

Anschließend werden die Herzen an die Langendorff-Apparatur angeschlossen und mit der Lösung B für etwa 5 min (siehe 3.4) perfundiert, bevor Lösung C (siehe 3.4) als Perfusionsmedium verwendet wird. Die ersten 40ml der Spülflüssigkeit werden zunächst verworfen, danach wird die Apparatur auf Reperfusion umgeschaltet. Nun werden zu 40ml der Perfusionslösung C nach fünf Minuten 25µl einer 100mmol/l CaCl₂-Lösung zugegeben. Nach weiteren fünf Minuten werden erneut 25µl der 100 mmol/l CaCl₂-Lösung und nach nochmals fünf Minuten werden wiederum 50µl der 100 mmol/l CaCl₂-Lösung zugegeben, so dass eine finale Ca²⁺-Konzentration von 0,1mmol/l erreicht wird.

Die Perfusionsflüssigkeit wird unter dem Mikroskop auf den Gehalt von Kardiomyozyten überprüft. Schließlich werden die Herzen nacheinander aus der Apparatur entnommen und auf einem Uhrglas der rechte Ventrikel sauber abgetrennt und verworfen. Der linke Ventrikel wird mit zwei Skalpellmessern zerschnitten und mit 25ml der aus der Apparatur entnommenen Perfusionslösung in einen Teflonbecher überführt. Dieser wird in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt und begast. Alle zwei Minuten werden nun die Gewebstückchen mit einer sterilen 25ml-Pipette aufgesaugt und langsam wieder auslaufen gelassen. Dieser Vorgang wird über zehn Minuten wiederholt und anschließend die entstandene Suspension in zwei 25ml Röhren überführt.

Das sich nun in Dispersion befindende Gewebe wird bei 400 U/min über zwei Minuten zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgesaugt und das entstandene Pellet in Lösung D (siehe 3.4) resuspendiert. Die Suspension wird nun erneut bei 400 U/min für zwei Minuten zentrifugiert, anschließend wird der Überstand auch hier abgesaugt, das Pellet in Lösung D resuspendiert und durch einen Nylonfilter (Büchnertrichter) filtriert. Die so hergestellte Zellsuspension wird auf vier 15ml-Röhren verteilt. Es erfolgt die Sedimentation der Zellen von einer Höhe von 5 cm für zehn Minuten. Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt, und die sedimentierten Zellen werden erneut mit Lösung D resuspendiert und nochmals über einen Zeitraum von 10 min sedimentiert. Als letzter Präparationsschritt werden die Zellen nun in M199+ Medium aufgenommen (siehe 3.4).

Neonatale Rattenkardiomyozyten

Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Müller-Werdan, Klinik für Innere Medizin III, Universitätsklinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zu Verfügung gestellt [95, 96].

Zum Anlegen der Kulturen werden ein bis drei Tage alte Ratten per Genickbruch getötet und in ein Becherglas mit 70% Ethanol getaucht. Anschließend werden die Extremitäten mit sterilen Kanülen fixiert und der Thorax mittels einer Schere eröffnet. Das Herz wird aus dem umgebenden Gewebe gelöst, mit Pinzetten entnommen und anschließend in eine Petrischale mit eiskalter PBS gelegt.

Ca. 50 Herzen werden mittels zweier steriler Skalpelle in 1mm³ große Stücke zerkleinert, und mit Hilfe einer abgebrochenen Pasteurpipette wird der Gewebeprei in ein Becherglas mit Rührer überführt. Es werden 10ml einer 37°C warmen Trypzinisierungslösung (siehe 3.4) zugesetzt und für 15 Minuten gerührt. Anschließend wird der Überstand verworfen. Den Zellen werden nun zehn mal

jeweils 5ml Trypinisierungslösung zugefügt, anschließend zehn Minuten lang gerührt und der Überstand gesammelt. Das Becherglas wird dabei mit steriler Aluminiumfolie abgedeckt und bei leichtem Rühren in den 37°C Brutschrank gestellt. Überstände werden mit einer Pasteurpipette abgenommen und in insgesamt zehn Gewebekulturröhrchen (GKR) gesammelt, in denen sich je 2ml Wachstumsmedium für Rattenkardiomyozyten befinden (siehe 3.4). Die GKR werden auf Eis gelagert, die Trypinisierungslösung wird bei 37°C belassen.

Die GKR werden über zehn Minuten bei 1400U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Im Anschluss werden die Überstände verworfen und die entstandenen Pellets in je 5ml Wachstumsmedium für Rattenkardiomyozyten resuspendiert.

Zur Bestimmung der Zelldichte vitaler Zellen in der Suspension wird diese mit Trypanblau verdünnt und die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Vitale Zellen sind in der Lage, bei intakten Membranen den Farbstoff Trypanblau auszuschließen, während bei abgestorbenen Zellen die Zellmembran für den Farbstoff durchlässig wird, so daß diese Zellen sich blau anfärben.

Die Zellsuspension wird anschliessend auf die gewünschte Dichte mittels Wachstumsmedium verdünnt. Die Zellkulturschalen werden zuvor mit BD Matrigel™ Matrix beschichtet (BD Bioscience). Hierfür wird das Matrigel in einem Verhältnis von 1:10 mit 199+ Medium gemischt und in die Zellkulturschalen gefüllt, anschließend werden die Schalen bei 37°C getrocknet. Schließlich wird in die vorbereiteten Schalen die Zellsuspension gegeben, wobei jeweils 400.000 vitale Zellen pro 25cm²- Zellkulturschalen ausplattiert werden.

3.3.2 Untersuchungen zur BMP2-induzierten Stressresistenz adulter Rattenkardiomyozyten

In einer ersten Serie von Experimenten soll analysiert werden, ob die Gabe von BMP2 die Widerstandsfähigkeit von adulten Kardiomyozyten gegenüber oxidativem Stress (Wasserstoffperoxid) erhöht. Hierfür wird zunächst aus einer 30%igen H₂O₂-Stammlösung eine 200mM H₂O₂-Lösung durch Verdünnung mit deionisiertem Wasser hergestellt. Von dieser Lösung werden anschließend 16µl mit 16ml Zellkulturmedium gemischt. Von dieser Lösung werden je 3ml den Zellkulturen hinzugefügt, so dass eine finale H₂O₂-Konzentration von 200µmol/l in den Kulturschalen resultiert. Als nächstes erfolgt bei einem Teil der Zellkulturen der Zusatz von BMP2 in einer finalen Konzentration von 40ng/ml, 80ng/ml und 160ng/ml. Die Rattenkardiomyozyten werden anschließend für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wird das Nährmedium unter Beibehalten der jeweiligen Konzentration von H₂O₂ und BMP2 vorsichtig gewechselt. Nach weiteren 24h Inkubation bei 37°C erfolgt am dritten Versuchstag die Fixierung und Beurteilung der Kulturen (siehe unten).

In einer weiteren Serie von Experimenten werden die Kardiomyozyten unter Hypoxie (2% Sauerstoff im Vergleich zu 21% Sauerstoff) inkubiert, wobei einem Teil der Kulturschale wiederum BMP2 in den genannten Konzentrationen zugegeben wird. Auch bei diesen Zellkulturen erfolgt

zwischenzeitlich ein Mediumwechsel, die Fixierung und Beurteilung der Zellen wird ebenfalls nach 72 Stunden vorgenommen.

Für die Bestimmung der vitalen und apoptotischen Zellen am Ende der 3tägigen Inkubationszeit wird das Nährmedium abgesaugt und in die Schalen frisch hergestellte Fixierungslösung aus 4% Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4) für 30 Minuten gegeben. Danach wird die Fixierungslösung abgesaugt und die Schalen werden mit PBS gewaschen. Nun wird mit einem Wattestäbchen ein trockener Kreis um eine Fläche in den Schalen gezogen und mit einem Fettstift (PAP-Pen) nachgefahren. Daraufhin werden die Zellen, die sich innerhalb dieses Kreises befinden, zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wird vorsichtig auf die Fläche eine frisch hergestellte Permeabilisierungslösung, bestehend aus 0,1% Triton X-100 in 0,1% NatriumCitrat, aufgetragen. Diese wirkt über fünf Minuten (gekühlt auf Eis) ein. Im Anschluss werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

Für den TUNEL-Assay (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) werden stets eine Positiv- sowie eine Negativ-Kontrolle mitgeführt, um die korrekte Funktion des Tests zu überprüfen. Zur Generierung der Positivkontrolle wird auf die fixierten, permeabilisierten Zellen DNase-I in einer Konzentration von 100µg/ml für 10 Minuten bei Raumtemperatur gegeben, um so DNA-Strangbrüche zu induzieren. In diesen 10 Minuten wird die TUNEL-Reaktionslösung nach den Angaben des Herstellers hergestellt. Für die Lösung A werden 50µl der Enzymlösung mit 100µl Verdünnungspuffer vermischt. Lösung B wird durch die Zugabe von 550µl PBS zu der Markierungslösung hergestellt. Hieraus werden 200µl entnommen und in ein extra Röhrchen für die Negativkontrolle gefüllt. Zu dem Rest der Lösung B wird nun 50µl Lösung A gegeben und bis zur Anwendung auf Eis gekühlt.

Nun werden alle Schalen mit PBS zweimal gewaschen, und die Reaktionslösung wird auf die Positivkontrolle und die echten Proben aufgetragen, der Negativkontrolle wird Lösung B (ohne Enzym) hinzugefügt. Die Zellen werden nun in Dunkelheit bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

Anschließend werden die Proben dreimal mit PBS gewaschen und die Zellkerne zehn Minuten mit Hoechst 33258 (Molecular Probes) in einer Konzentration von 5µg/ml gegengefärbt. Im nächsten Schritt wird der überschüssige Farbstoff durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen werden mit PBS bedeckt und unter einem Fluoreszenzmikroskop (Leica MZFL III, FluorIII; Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Germany) bei einer 100fachen Objektiv-Vergrößerung angesehen und fotografiert. Hierbei werden jeweils sowohl die mit dem Hoechst-Farbstoff angefärbten Zellkerne fotografiert (blaues Fluoreszenzsignal), als auch die durch die TUNEL-Reaktion grün markierten, apoptotischen Zellkerne.

Die Photographien werden für die spätere Auswertung in dem Programm „Adobe Photoshop 7.2“ auf die gleiche Bildgröße und Auflösung formatiert. Die auf den Photographien sichtbaren Zellkerne werden manuell ausgezählt.

3.3.3 Bestimmung der Auswirkungen von BMP2 auf Kontraktilitätsparameter neonataler Rattenkardiomyozyten

Zur Bestimmung der Kontraktilitätsparameter der neonatalen Rattenkardiomyozyten wird ein im Labor der Universitätsklinik für Innere Medizin III der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg seit mehreren Jahren etabliertes Verfahren verwendet [95, 96]. Hierbei werden mit Hilfe eines Polarisationsmikroskopes und einer CCD-Kamera (Charge-coupled Device-Kamera) die spontan kontrahierenden neonatalen Rattenkardiomyozyten in der Zellkultur erfasst und auf einen Computermonitor übertragen. Durch die Kontraktionen der Zellen entstehen lokale Helligkeitsschwankungen, die registriert und zur Beschreibung des Kontraktionsverhaltens verwendet werden. Um den günstigsten Erfassungsbereich maximaler Helligkeitsschwankungen am Kardiomyozyten zu finden, wird mit Hilfe der PC-Maus eine Photodiode über den ausgewählten Bildausschnitt (ROI) von 20*20 Pixeln des bewegten Bildes verschoben. Die Diode wird so positioniert, dass mit einer Helligkeitszunahme die Kontraktion (Systole) erfasst wird. Der PC berechnet den durchschnittlichen Helligkeitswert im ROI für jedes Halbbild und zeigt das Ergebnis an einem vertikalen Balkenindikator an. Die Helligkeitsschwankungen sind an den Grenzen kontrahierender Zellen besonders hoch. Ist die Einstellung optimal, pulsiert der Balkenindikator mit konstanter Amplitude und der jeweiligen Herzfrequenz von 0,2 bis 5 Hz. Ist ein optimaler Untersuchungsbereich gefunden, wird eine Aufzeichnung gestartet, und nach Ablauf einer zuvor festgelegten Auswertungsdauer (1min) werden die gemessenen Helligkeitsänderungen als Datei gespeichert [97]. In dieser Versuchsanordnung werden neonatale Rattenkardiomyozyten analysiert, denen BMP2 in verschiedenen Konzentrationen (0, 40, 80 bzw. 160 ng/ml) zugefügt wird. Beurteilt wird sowohl die Kontraktionsfrequenz der Zellen als auch die Geschwindigkeit der Einzelkontraktionen als ein Maß der Inotropie.

In ergänzenden Experimenten werden die Zellen durch Applikation eines elektrischen Feldes festfrequent mit 2Hz stimuliert, wobei erneut die Geschwindigkeit der Einzelkontraktionen erfaßt wird.

3.4 Reagenzien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Lösungen werden folgendermaßen hergestellt:

PBS-Lösung

80 g NaCl werden mit 2,0 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄ und 2,0g KH₂PO₄ in einem sterilen Gefäß gemischt und auf 1000ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Der pH-Wert wird auf 7,2 bis 7,4 eingestellt.

4% Paraformaldehyd -Lösung (PFA)

40g PFA werden in 800ml deionisiertem Wasser unter Rühren auf 60°C unter einem Abzug erhitzt. Es werden einige Tropfen NaOH zugegeben, bis sich die Lösung klärt. Im nächsten Schritt werden nun 100ml einer 10fach konzentrierten PBS-Lösung hinzugeben und die Lösung mit deionisiertem Wasser auf 1000ml aufgefüllt. Anschließend wird die Lösung filtriert und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Die 4%ige PFA-Lösung wird in Kunststoffbehälter gefüllt und bei -20°C gelagert.

Mowiol:

2,4g Mowiol werden mit 6g Glycerol in einem Gefäß gut vermischt, anschließend werden 6ml deionisiertes Wasser beigelegt. Die Lösung wird nun für ca. vier Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend werden 12ml 0,2M Tris (pH 8,5) hinzugefügt und die Lösung wird auf einer Heizplatte unter ständigem Rühren auf 50°C erhitzt, bis sich die Lösung klärt (ca. 10 Minuten). Das fertige Mowiol wird bei -20°C gelagert.

Lösungen für die Präparation adulter Rattenkardiomyozyten

Lösung A (440ml): Joklik-Minimum Essential Medium (=MEM)

NaHCO ₃	24,0 mmol/l		
MgSO ₄	0,6 mmol/l	DL-Carnitin	1,0 mmol/l
Creatin	10,0 mmol/l	Taurin	20,0 mmol/l

Lösung B (150ml): Lösung A + 1mmol/l CaCl₂ + Trypsin (60 – 180 U/ml) (100ml)

Lösung C (150ml): Lösung A + 0,1% Rinderserum Albumin + Trypsin (60 – 180 U/ml)
+ Collagenase (90 U/ml)

Lösung D (140ml): Lösung A +1% BSA FAF + 0,1 mmol/l CaCl₂

Lösung A-D werden mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast. Bei 37°C wird der pH auf 7,2 eingestellt. Während der Reperfusion wird der pH-Wert mit 1N HCl korrigiert.

Medium 199+ (M199+)

M199 + 10% *newborn calf serum* (NCS) + 1% Pen/Strep (100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin)

Lösungen für die Präparation neonataler Rattenkardiomyozyten:

CMRL-Grundmedium: NaCl (135 mM), KCL (5,40 mM), NaH₂PO₄* H₂O (0,36 mM)
CaCl * 2 H₂O (1,30 mM), MgSO₄ * 7 H₂O (0,97 mM),
Na₂HPO₄ * 2 H₂O (1,49 mM), Glucose (wasserfrei) (7,5 mM),

HEPES (10 mM)

Antibiotikum: Gernebcin (= Tobramycin) 40mg/l

Wachstumsmedium für neonatale Rattenkardiomyozyten:

CMRL-Grundmedium (400ml) + Horse-Serum (HS) 10% (50ml) + Fetal Calf Serum (FCS) 10% (50ml)

Phosphat buffered saline A / Glucose, Ca²⁺, Mg²⁺ free (PBSAG 10*), Ansatz für 1l:

NaCl [137 mM] (80g) + KCl [2,7 mM] (2g) + Na₂HPO₄ * 2 H₂O [10,6 mM] (18,8g) + KH₂PO₄ [2,1 mM] (2,9g) + Glucose (wasserfrei) [5mM] (9,0g) + Glucose [5mM] (9,91g)

PBSAG 1* : PBSAG 10* 1:10 verdünnen

Trypsinisierungslösung:

Trypsin : 1:250 (Fa. Serva) 2,5g auf 100ml PBSAG 1*

Collagenase: Worthington (Collagenase Typ CLS II, Fa. Biochrom KG, Berlin, Germany)

1,0g auf 250ml PBSAG 1*

5ml Trypsin und 9ml Collagenase in einer sterilen Flasche auf 100ml mit PBSAG auffüllen.

Tab.1: Verwendete Materialien unter Angabe des Herstellers

Material	Hersteller
ALTROMIN STANDARD-DIÄT 1320	Altromin Gesellschaft für Tierernährung GmbH, Lage, Deutschland
FORANE®/ FORENE® (Isofluran)	Drägerwerk AG Lübeck, Deutschland
Rimadyl	Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland
BMP2	Institut für Biotechnologie Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg, Deutschland
Polyfreeze™ Tissue Freezing Medium™	Polyscience, Inc., Warrington, USA
Vectabond™ Reagent for Tissue Section Adhesion	Vector Laboratories, Burlingame, USA
ACCUSTAIN® Bouin's Solution	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, München, Deutschland
Accustain™ Trichrome Stain (Masson)	Sigma Diagnostics, München, Deutschland
Fluorescein Peanut agglutinin	Vector Laboratories, Burlingame, USA

Rhodamine-Griffonia Simplicifolia Lectin I (GSL I, BSL I)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Hoechst 33258	Molecular Probes, Inc., Eugene, USA
BD Matrigel™ Matrix	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
In situ cell death detection Kit, Fluorescein	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Leica Bi-Ocular Mikroskop (Leica DM IL)	Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Heidelberg, Deutschland
Leica MZFL III, FluoIII™	Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Heidelberg, Deutschland
LEJ (Fluoreszenzlichtquelle)	Leistungselektronik Jena GmbH, Jena, Deutschland
LEICA DM IRE2	Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Heidelberg, Deutschland
Mouse Ventilator MiniVent (Typ: 845)	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
Mikrotom-Kryostat HM 500 OM	Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf, Deutschland

3.5 Statistik

In allen Abbildungen werden, sofern nicht anders angegeben, die Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Für die Prüfung auf Signifikanz wurde der t-Test für gepaarte bzw. ungepaarte Stichproben verwendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1 Nachweis der biologischen Aktivität von BMP2

Um die biologische Aktivität des für die eigenen Experimente verwendeten, rekombinanten BMP2 vor Beginn der Versuchsreihen zu testen, werden NIH3T3-Fibroblasten mit unterschiedlichen BMP2-Konzentrationen im Nährmedium inkubiert. Anschließend wird die Aktivität des Enzyms Alkalische Phosphatase, die typischerweise in dieser Zelllinie nur nach Induktion durch BMP2 exprimiert wird, mittels Messung der Absorbanz bestimmt. Abbildung 6 zeigt, dass in dem eingesetzten Konzentrationsbereich von 0 bis 200 ng/ml ein linearer Zusammenhang zwischen BMP2-Konzentration und Enzyminduktion besteht. Dies belegt, dass das verwendete BMP2 eine dosisabhängige Induktion des Enzyms Alkalische Phosphatase bewirkt und somit biologisch aktiv ist, es eignet sich daher für die Anwendung in den im Folgenden geplanten Versuchen.

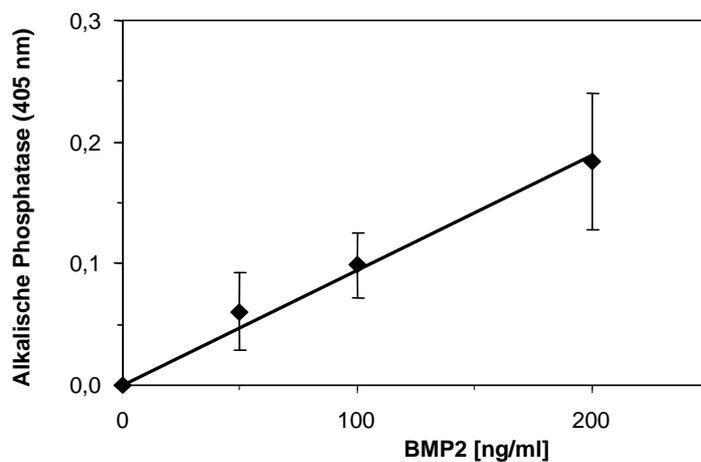


Abb.6: Nachweis der biologischen Aktivität von BMP2 anhand der Induktion des Enzyms Alkalische Phosphatase.

4.2 In-vivo-Untersuchungen

Nachdem die biologische Aktivität des rekombinanten BMP2 sichergestellt war, sollten die Auswirkungen der Gabe von BMP2 im Myokardinfarktmodell der Maus analysiert werden. Hierfür wurde bei adulten weiblichen Mäusen 30 Minuten nach i.v.-Gabe von 80ng/g KG BMP2 bzw. von PBS (Kontrolle) die linke Koronararterie operativ verschlossen, die resultierenden Auswirkungen wurden im Verlauf mittels Erfassung morphometrischer Daten, serieller Echokardiographie sowie durch histologische Analysen untersucht. Um die unspezifischen Auswirkungen der OP, die nicht durch die Infarkt-Induktion begründet sind, abgrenzen zu können, wurde bei einigen Tieren lediglich eine Schein-Operation (Sham) vorgenommen.

4.2.1 Morphometrie

Als morphometrische Vergleichparameter werden über den Zeitraum der Versuchsdauer die Körpergewichte sowie am Ende des Beobachtungszeitraumes die Organgewichte von Lunge, Leber und Herz, sowie die Länge der Tibia der Tiere bestimmt.

Zu Beginn der Versuchsreihe werden alle Tiere gewogen und nur diejenigen für die Versuche zugelassen, welche ein Mindestkörpergewicht von 30g aufweisen. Die Ausgangsgewichte werden dokumentiert, und die Tiere werden nach der experimentellen Induktion eines Myokardinfarktes durch Ligatur der linken Koronararterie im Verlauf der Versuchsreihe einmal wöchentlich gewogen. Tabelle 1 gibt die mittleren Körpergewichte im Verlauf der Versuchsdauer wieder.

Tab.2: Mittelwerte der Körpergewichte der verwendeten Versuchstiere. *= p<0,05 innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe im Vergleich zum präoperativen Wert, # = p<0,05 im Vergleich zur Sham-Gruppe am jeweiligen Untersuchungszeitpunkt)

Körpergewicht [g]				
	Präoperativ	7d postoperativ	14d postoperativ	21d postoperativ
Sham (N= 9)	38,2 ± 1,2	36,7 ± 1	37,6 ± 0,9	37,4 ± 1,4
BMP2 (N= 14)	37,2 ± 1,5	34,3 ± 1,1	33,9 ± 1,1 *	34,0 ± 1,1 *#
PBS (N= 15)	35,2 ± 1,0	33,9 ± 1,1	33,3 ± 1,1*#	33,8 ± 1,2*#

Die Auswertung der präoperativ erfassten Körpergewichte zeigt, dass sich die Tiere der Versuchsgruppen im Hinblick auf die Ausgangsgewichte nicht unterscheiden. Bei den scheinoperierten Mäusen findet sich während der Untersuchungen keine relevante Änderung der Körpergewichte. Es lässt sich zwar 7 Tage nach dem OP-Trauma eine leichte Gewichtsabnahme feststellen, die Körpergewichte normalisieren sich im Verlauf der Untersuchungen dann jedoch wieder. Nach Induktion der Myokardinfarkte lässt sich sowohl innerhalb der BMP2- als auch der PBS-Gruppe eine anhaltende Abnahme der Körpergewichte registrieren, welche in beiden Gruppen 14 und 21 Tage nach dem Infarkt signifikant ist. Zwischen beiden Infarktgruppen ergibt sich in Bezug auf die Veränderungen der Körpergewichte der Versuchstiere kein relevanter Unterschied.

Am Ende der Versuchsreihe werden nach der Organentnahme die Gewichte der Herzen, der Lungen und der Leber aller Tiere bestimmt (Tabelle 2). Es finden sich hierbei keine Unterschiede der körperrgewichts-bezogenen Organgewichte zwischen den verschiedenen Gruppen.

Tab.3: Mittlere Organgewichte der Versuchsgruppen 21 Tage nach Myokardinfarkt (* = $p \leq 0,05$ zu Sham).

	Sham (N= 9)	BMP2 (N= 14)	PBS (N= 15)
Herz [mg]	270 ± 1,2	300 ± 2	280 ± 1
relatives Herzgewicht [mg/g]	7,1 ± 0,4	8,9 ± 0,8	8,2 ± 0,4
Lunge [mg]	461 ± 37	535 ± 61	555 ± 57
relatives Lungengewicht [mg/g]	12,0 ± 0,9	15,4 ± 1,6	15,9 ± 1,7
Leber [mg]	2066 ± 87	1775 ± 61*	1869 ± 81
relatives Lebergewicht [mg/g]	54,1 ± 7	52,1 ± 2,3	52,7 ± 2,4

4.2.2 Überlebensanalyse

Um zu untersuchen, inwiefern die Gabe von BMP2 das Überleben nach Myokardinfarkt beeinflusst, wird bis zum Versuchsende (21 Tage nach LAD-Verschluss) das vorzeitige Versterben von Versuchstieren dokumentiert. Die aus den Daten ermittelten Überlebenskurven sind in Abbildung 7 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass innerhalb der Gruppe der Schein-operierten Tiere keine vorzeitigen Todesfälle auftreten. Dagegen versterben von den Mäusen, bei denen nach Vorbehandlung mit PBS ein Myokardinfarkt induziert wurde, insgesamt 12 von 26 Tieren. Es fällt hierbei auf, dass der überwiegende Anteil der Todesfälle sich innerhalb der ersten 24 Stunden nach LAD-Verschluss ereignet (10 Tiere = 38%), weitere 2 Tiere (8%) versterben in den darauf folgenden 48 Stunden. In den sich anschließenden Tagen sind dann jedoch keine weiteren Todesfälle zu beobachten.

In der mit BMP2 behandelten Gruppe überleben signifikant mehr Tiere das akute Infarktereignis im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe (14 von 17 (82%) BMP2, vs. 16 von 26 (62%) PBS). Im zeitlichen Verlauf versterben weitere 3 Tiere der BMP2-Gruppe bis einschließlich zum zweiten postoperativen Tag. Zu einem späteren Zeitpunkt werden auch in dieser Gruppe keine weiteren Todesfälle beobachtet.

Zum Zeitpunkt des Versuchsendes 21 Tage nach der operativen LAD-Ligatur leben noch 11 von 17 Tieren der BMP2-Versuchsgruppe gegenüber 14 von 26 der PBS-Versuchsgruppe, dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant ($p=0,16$).

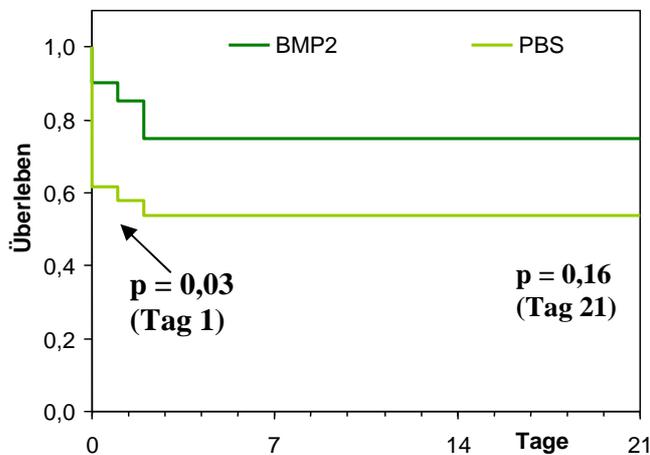


Abb.7: Überleben adulter ICR-Mäuse nach Induktion eines Myokardinfarktes durch operativen LAD-Verschluss. Den Tieren wurde 30 Minuten vor der LAD-Ligatur eine i.v.-Injektion von entweder PBS oder 80ng/g BMP2 appliziert.

4.2.3 Echokardiographie

Um die Auswirkungen der Myokardinfarkte und der Gabe von BMP2 auf die Herzfunktion *in vivo* analysieren zu können, werden die Mäuse mittels transthorakaler Echokardiographie untersucht. Von den Tieren werden sowohl präoperativ als auch 21 Tage nach Induktion des Myokardinfarktes Ultraschallaufnahmen des Herzens in der parasternalen kurzen Achse in Höhe der Papillarmuskel angefertigt. Die erhobenen Werte sind in Tabelle 3 dargestellt.

Um Veränderungen der linksventrikulären Geometrie in Hinblick auf eine sich entwickelnde Dilatation zu beurteilen, wird der linksventrikuläre Innen-Diameter enddiastolisch (LVIDD) sowie systolisch (LVIDS) bestimmt. Die Pumpfunktion des linken Ventrikels wird sowohl über 1-dimensionale Parameter aus dem M-Mode (*shortening fraction* (FS), EF nach Teichholz) als auch anhand des im B-Bild bestimmten 2-dimensionalen Parameter *fraction of area change* (FAC) bestimmt. Ergänzend wird aus den RR-Intervallen die Herzfrequenz bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich bezüglich der Herzgröße und -funktion keine Unterschiede zwischen der unbehandelten Kontrollgruppe und den schein-operierten Tieren finden lassen. Bei den Tieren mit Ligatur der LAD finden sich dagegen deutliche Veränderungen der linksventrikulären Geometrie und Pumpfunktion. Es zeigt sich sowohl bei der PBS- als auch der BMP2-Gruppe eine signifikante Dilatation des linken Ventrikels, gleichzeitig findet sich eine signifikante Abnahme der *shortening fraction*, der Ejektionsfraktion und der FAC. Zwischen den beiden Infarktgruppen besteht allerdings kein signifikanter Unterschied bezüglich der erhobenen Messwerte (LVIDD, LVIDS, FS, FAC und EF).

Auch bei der Analyse der Herzfrequenz zeigt sich ein deutlicher Effekt der LAD-Ligatur: sowohl die Tiere der PBS- als auch der BMP2-Gruppe haben im Mittel eine signifikant höhere Herzfrequenz als die Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe bzw. scheinoperierte Tiere. Innerhalb der Tiere mit Myokardinfarkt kann festgestellt werden, dass die Herzen der mit BMP2 behandelten Versuchsgruppe eine signifikant höhere Schlagfrequenz aufweisen als die der PBS-Versuchsgruppe.

Tab.4: Echokardiographische Parameter des linken Ventrikels. # p<0,05 vs. Sham, * p<0,05 vs. PBS.

	Kontrolle (keine OP)	Schein-OP (Sham)	PBS (21d nach LAD- Verschluss)	BMP2 (21d nach LAD- Verschluss)
LVIDD [mm]	4,4 ± 0,1	4,3 ± 0,1	5,7 ± 0,1 [#]	5,6 ± 0,2 [#]
LVIDS [mm]	2,6 ± 0,1	2,6 ± 0,1	4,9 ± 0,2 [#]	4,7 ± 0,3 [#]
FS	0,42 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,15 ± 0,02 [#]	0,17 ± 0,04 [#]
EF (Teichholz)	0,78 ± 0,02	0,78 ± 0,03	0,35 ± 0,04 [#]	0,39 ± 0,06 [#]
FAC [%]	62 ± 1	62 ± 1	29 ± 3 [#]	30 ± 3 [#]
Frequenz [min⁻¹]	488 ± 5	477 ± 2	515 ± 6 [#]	542 ± 6 ^{#*}

4.2.4 Bestimmung der Infarktgrößen

Für die Bestimmung der Infarktgrößen werden die Herzen der Tiere, die bis zum Versuchsende überlebt haben, anhand histologischer Schnittpräparate aufgearbeitet. Von den nach standardisierter *in situ*-Fixierung entnommen Herzen werden Kryoschnitte angefertigt, und mittels Trichromfärbung werden die verschiedenen Gewebeanteile wie unter 3.2.6. beschrieben, gefärbt, so dass sich im Ergebnis die Muskulatur rot färbt, während sich fibröses Narbengewebe blau darstellt.

Abbildung 8 zeigt Beispiele von Trichrom-gefärbten Präparaten der verschiedenen Versuchsgruppen. Das Herz eines schein-operierten Tieres wird in Abbildung 8A gezeigt, anhand dieses Schnittpräparates können die verschiedenen anatomischen Strukturen eines gesunden Mauseherzens beschrieben werden. Der linke Ventrikel (LV) weist eine sehr muskulöse Wand auf und ist von seiner äußeren und inneren Formgebung annähernd rund. In den epikard-nahen Anteilen sowie teilweise auch in tieferen Muskelschichten sind einige Anschnitte von Koronargefäßen zu erkennen. An der freien Wand des LV sind die beiden Papillarmuskel angeschnitten, die in das Lumen des Ventrikels hineinragen. Die freie linksventrikuläre Wand geht am unteren Bildrand in das *Septum interventriculare* über, das den LV vom sehr viel schmalen rechten Ventrikel (RV) trennt. Der rechte Ventrikel schmiegt sich halbmondförmig an das *Septum interventriculare*, die

Muskulatur seiner Wand ist wesentlich dünner als die des linken Ventrikels, und auch das Lumen des RV ist deutlich schmaler als das des linken Ventrikels.

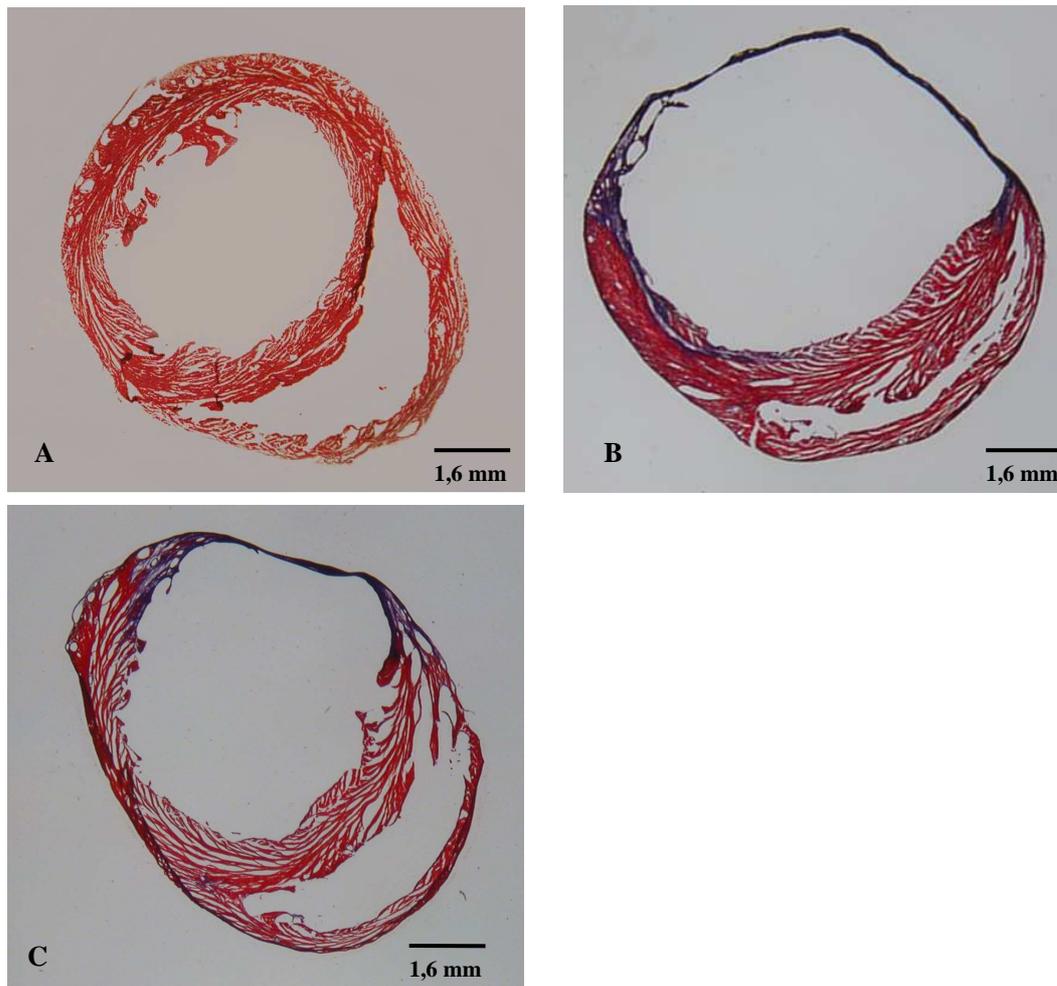


Abb.8: Infarktgrößenbestimmung. Kryoschnitte (25 μ m) von Herzen adulter ICR-Mäuse 21 Tage nach experimenteller Induktion eines Myokardinfarktes durch Ligatur der linken Koronararterie. A) Herz eines schein-operierten Tiers (Sham, kein Infarkt), B) infarziertes Herz nach i.v. Injektion von BMP2 (80ng/g) 30 min. vor Koronarligatur, C) infarziertes Herz nach i.v. Injektion von PBS 30 min. vor Koronarligatur.

Im Vergleich zu diesen gesunden Herzen weisen die infarzierten Herzen deutliche Veränderungen auf (Abb. 8B und C): in der linksventrikulären Vorderwand ist bei beiden Herzen deutlich ein transmuraler Infarkt anhand der blau gefärbten Narbe zu erkennen. Im Narbenbereich ist die Wand des linken Ventrikels im Vergleich zu den nicht infarzierten Bereichen erheblich ausgedünnt. Die größte Infarktausdehnung zeigt sich an den endokardialen Myokardanteilen. Während in den Infarkttrandbereichen die äußeren, epikardialen Muskulaturschichten noch erhalten sind und sich rot darstellen, finden sich die inneren, endokardnahen Schichten hingegen infarziert und zu einer, sich blau anfärbenden fibrösen Narbe umgewandelt. Desweiteren ist das nicht infarzierte *Septum*

interventriculare der Infarkt-geschädigten Herzen im Vergleich zu schein-operierten Tieren hypertrophiert, und der rechte Ventrikel weist ein größeres Lumen auf.

Aber auch die beiden Infarktgruppen weisen Unterschiede zueinander auf. Abbildung 8B zeigt das infarzierte Herz der mit BMP2 behandelten Versuchsgruppe, Abbildung 8C eines der PBS-Versuchsgruppe. Beide Herzen weisen transmurale Vorderwandinfarkte auf, allerdings ist die Infarktausdehnung unterschiedlich ausgeprägt. Der Infarkt des Herzens aus der PBS-Versuchsgruppe betrifft nur die anteriore und anterolaterale Wand. Nicht infarziert sind dagegen das Septum interventriculare und die Hinterwand. Hier sind die Papillarmuskeln nicht von dem Infarkt betroffen und ragen noch sichtbar in das linksventrikuläre Lumen vor. Insgesamt ist die Infarktausdehnung gegenüber dem der BMP2-Versuchsgruppe deutlich geringer. Der Infarkt der BMP2-Versuchsgruppe betrifft beinahe die gesamte freie Wandfläche des linken Ventrikels und greift auch auf den anterioren Anteil des Septum interventriculare über. Infarziert sind hier auch die Papillarmuskeln, welche als solche kaum noch erkennbar sind. Deutlich wird weiterhin, dass das linksventrikuläre Lumen sich mit der Infarktgröße verändert. Das Lumen des infarzierten Herzen der BMP2-Versuchsgruppe ist im Vergleich mit dem der PBS-Versuchsgruppe vergrößert.

Bei der histologischen Quantifizierung der Infarktgrößen (Abb.9) zeigt sich, dass die mittlere Infarktausdehnung der mit BMP2 behandelten Mäuse mit $61 \pm 8\%$ signifikant größer ist als die der mit PBS behandelten Tiere, welche eine mittlere Infarktausdehnung von $46 \pm 9\%$ aufweisen ($p < 0,05$).

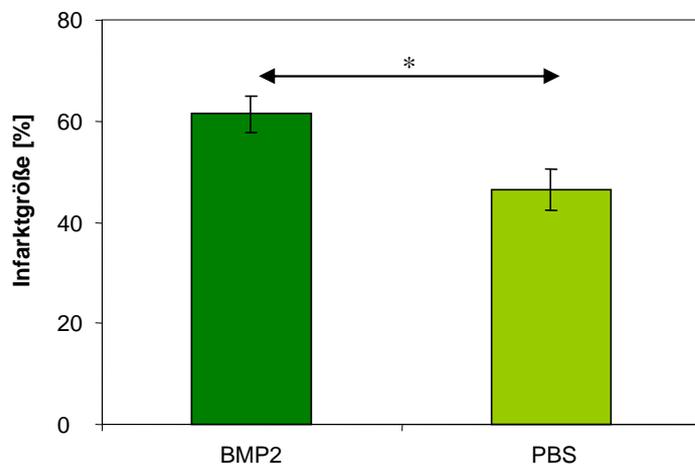


Abb.9: Histologische Infarktgrößenbestimmung. Vergleich der Infarktgrößen beider Versuchsgruppen 21 Tage nach experimenteller Induktion eines Myokardinfarktes durch Ligatur der linken Koronararterie. Berücksichtigt sind nur Tiere, die bis zum 21 Tag nach dem Myokardinfarkt überlebt haben, vorzeitig verstorbene Tiere fließen nicht in die Berechnung mit ein. * $p < 0,05$

4.2.5 Bestimmung des Postinfarkt-Remodelings

Zur Beurteilung des Postinfarkt-Remodelings des primär nicht vom Infarkt betroffenen Myokards werden $10\mu\text{m}$ dicke Kryoschnitte der Herzen untersucht. Mikroskopisch wird das *Septum*

interventriculare aufgesucht und die Myozytenquerschnittsfläche (MCSA) sowie die interstitielle Kollagenfraktion (ICF) als typische Parameter des Remodelings bestimmt. In Abbildung 10 sind exemplarisch histologische Präparate der verschiedenen Versuchsgruppen dargestellt. Das grün angefärbte Kollagen umgibt die Kardiomyozyten und macht deren äußere Form sichtbar. Zentral in den Herzmuskelzellen gelegen stellt sich der Zellkern blau dar.

Abbildung 10A zeigt einen repräsentativen Ausschnitt aus dem *Septum interventriculare* einer schein-operierten Maus. Die Myozyten liegen hier eng beieinander und werden nur von einem schmalen Saum interstitiellen Kollagens umgeben. Die äußere Form und Länge der einzelnen Muskelzellen variiert geringfügig. Der überwiegende Anteil der Zellen, in denen zentral ein Zellkern angeschnitten ist, ist von der Querschnittsfläche weitestgehend ähnlich.

Im Vergleich mit diesem Präparat fallen in den in Abbildung 10B und C gezeigten Ausschnitten des *Septum interventriculare* infarktgeschädigter Herzen mehrere Unterschiede ins Auge. Der Anteil des interstitiellen Kollagens ist vermehrt, und auch die Querschnittsflächen der einzelnen Kardiomyozyten sind deutlich vergrößert. Aber auch zwischen den beiden Infarktgruppen fallen Unterschiede auf. Die Myozytenquerschnittsflächen des in Abbildung 10C gezeigten Präparates aus der BMP2-Versuchsgruppe sind im Mittel größer als die Querschnittsflächen des in Abbildung 10B dargestellten Präparates der PBS-Versuchsgruppe.

Bei der quantitativen Ausmessung der MCSA zeigt sich, dass die Myozytenquerschnittsflächen im *Septum interventriculare* herzgesunder Mäuse im Mittel $151 \pm 4 \mu\text{m}^2$ beträgt. Die Myozyten der mit PBS vorbehandelten Infarktgruppe sind mit einer mittleren Querschnittsfläche von $188 \pm 8,4 \mu\text{m}^2$ im Vergleich zu der gesunden Kontrolle signifikant vergrößert. Auch die der mit BMP2 vorbehandelten infarzierten Herzen sind mit einer mittleren Querschnittsfläche von $217 \pm 7 \mu\text{m}^2$ im Vergleich mit der gesunden Kontrolle signifikant vergrößert. Zwischen den Infarktgruppen besteht ein signifikanter Unterschied: die BMP2-Versuchsgruppe hat im Mittel signifikant größere Myozytenquerschnittsflächen gegenüber der PBS-Vergleichsgruppe ($p = 0,013$) (Abb.11).

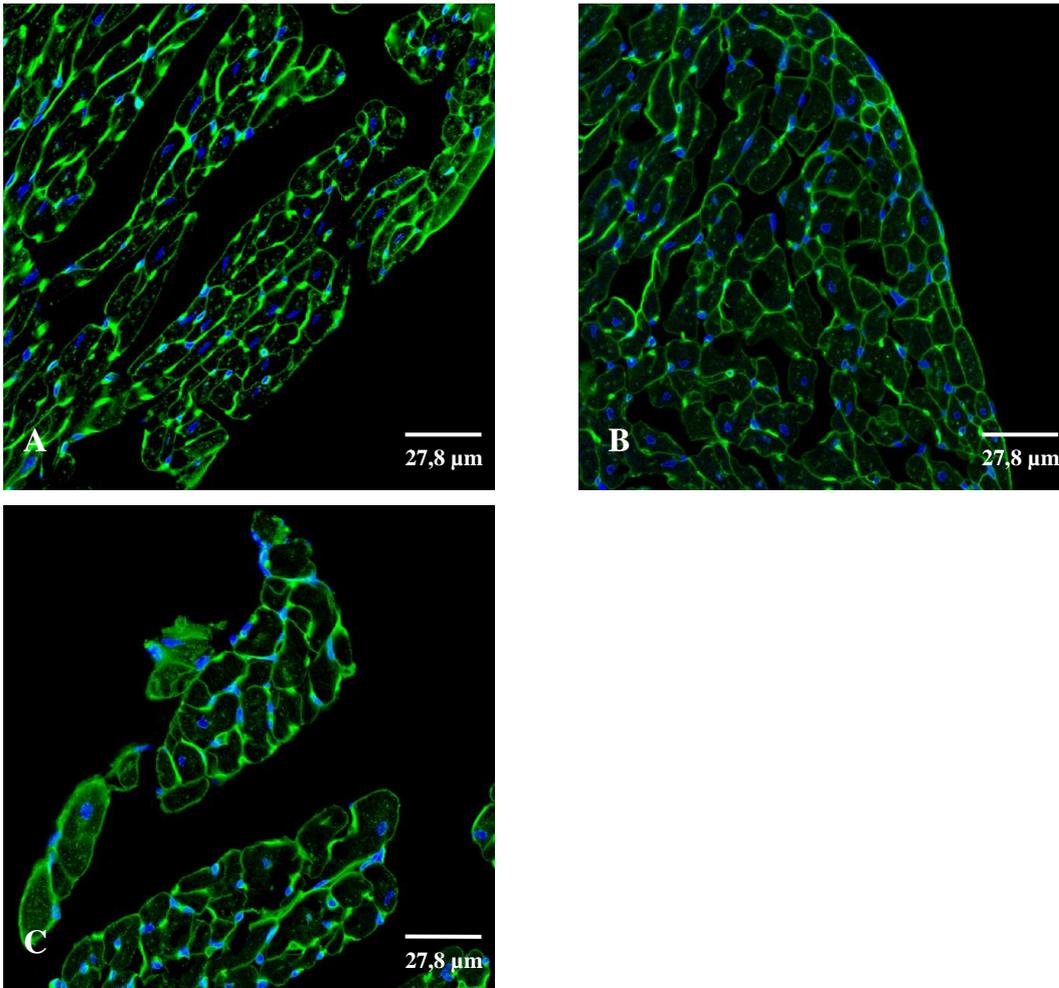


Abb.10: Kryoschnitte (10µm) von Herzen adulter ICR-Mäuse 21 Tage nach experimenteller Induktion eines Myokardinfarktes durch Ligatur der linken Koronararterie. Ausschnitt aus dem *Septum interventriculare*. Das die Kardiomyozyten umgebende interstitielle Kollagen ist grün angefärbt, Zellkerne blau. A) Gruppe der schein-operierten Mäuse, B) mit PBS behandelte Tiere, C) mit BMP2 behandelte Tiere

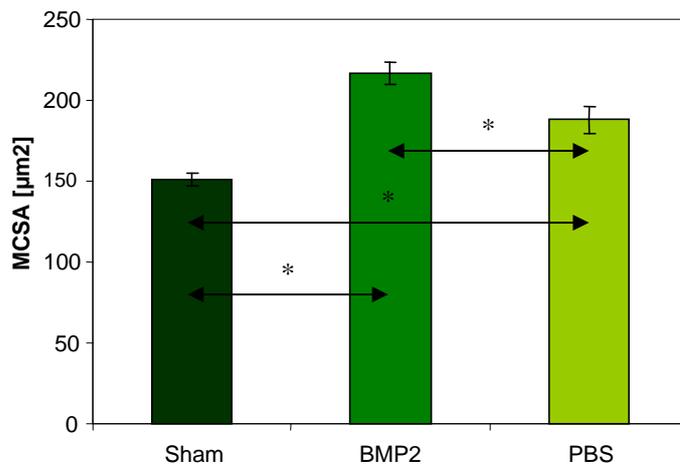


Abb.11: Darstellung der mittleren Myozytenquerschnittsflächen im *Septum interventriculare* 21d nach Myokardinfarkt. Signifikanz-Niveaus: * < 0,05.

Bei der Ermittlung der interstitiellen Kollagen-Fraktion (ICF) wird auch das Gefäßwandendothel angefärbt. Um eine exakte Bestimmung der ICF zu erlangen, wird das Gefäßwandendothel und damit der Kollagenanteil in den Gefäßwänden separat angefärbt und von der ICF subtrahiert. In Abbildung 12 wird das gefärbte Endothel der Kryoschnitte im Bereich des Septum interventriculare der Versuchsgruppen gezeigt.

Die Messung der ICF ergibt für die schein-operierten Tiere ein mittlerer Kollagenanteil von $5,2 \pm 0,3\%$. Mit einer mittleren interstitiellen Kollagenfraktion von $6,1 \pm 0,2\%$ in der PBS-Versuchsgruppe und $6,5 \pm 0,2\%$ in der BMP2-Versuchsgruppe weisen die infarktgeschädigten Herzen einen zwar tendenziell einen höheren Anteil an interstitiellem Kollagen im Vergleich zur gesunden Kontrolle auf, dieser Unterschied ist allerdings statistisch nicht signifikant. Auch zwischen den Infarktgruppen besteht bezüglich der mittleren interstitiellen Kollagen-Fraktion kein signifikanter Unterschied. Die Ergebnisse der Messung sind in Abbildung 13 als Diagramm dargestellt.

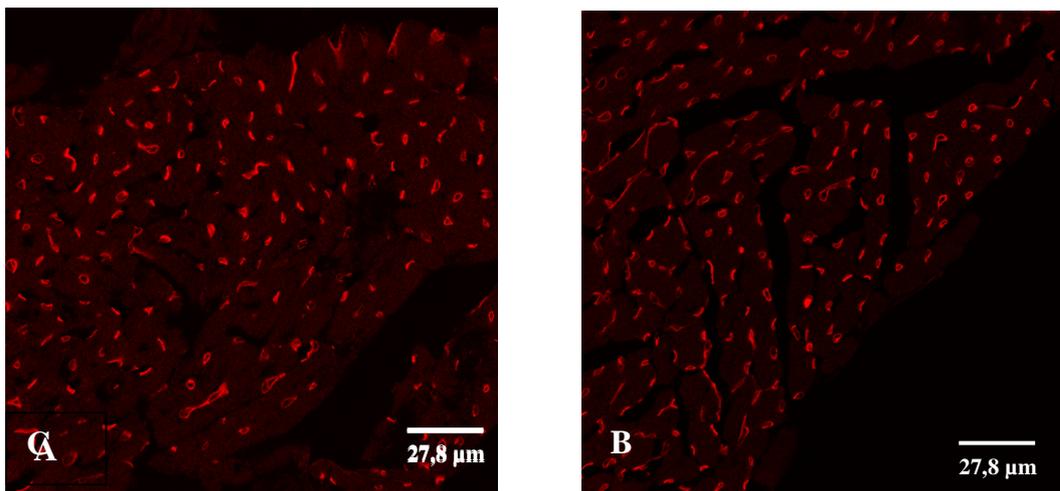


Abb.12: Kryoschnitte ($10\mu\text{m}$) von Herzen adulter ICR-Mäuse 21 Tage nach experimenteller Induktion eines Myokardinfarktes durch Ligatur der linken Koronararterie. Ausschnitt aus dem *Septum interventriculare*. Das Gefäßwandendothel ist rot. A) Gruppe der schein-operierten Mäuse, B) mit PBS behandelte Tiere, C) mit BMP2 behandelte Tiere.

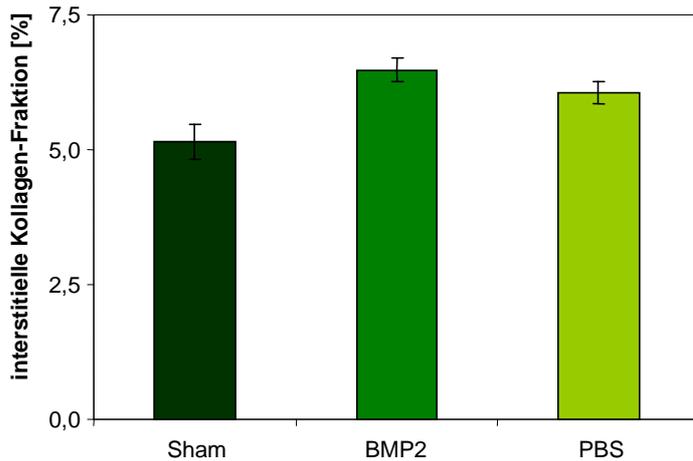


Abb.13: Quantifizierung der Interstitiellen Kollagen-Fraktion im Bereich des *Septum interventriculare* 21 Tage nach Induktion eines Myokardinfarktes durch Ligatur der LAD.

4.2.6 Lichtmikroskopische Untersuchung der Organpräparate von Lunge, Leber und Zwerchfell

Zur Beurteilung der histomorphologischen Differenzen zwischen den Behandlungsgruppen bezüglich weiterer Organsysteme wurden 25µm dicke Schnittpräparate von Lunge, Leber und Zwerchfell der Tiere angefertigt und ebenfalls nach dem Trichrom-Protokoll gefärbt. Die Lungengewebe zeigten typischerweise Anschnitte der Bronchien und der Alveolen. Die Schnittpräparate der Versuchsgruppen unterschieden sich nicht voneinander, Veränderungen der Gewebestruktur konnten nicht festgestellt werden. Die Präparate der Leber zeigten in beiden Versuchsgruppen eine normale Läppchenstruktur, die Lobuli und Zentralvenen waren gut erkennbar, die intrahepatischen Gallengänge nicht gestaut. Die untersuchten Zwerchfellmuskeln wiesen typische Skelettmuskelmerkmale auf. Die einzelnen Fasern lagen dicht beieinander, lichtmikroskopisch war kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen erkennbar. Insbesondere fanden sich bei keinem Organ Anhalte für eine ektope Knochen- oder Knorpelbildung.

4.3 Zellkulturversuche

4.3.1 Auswirkungen von BMP2 auf isolierte Kardiomyozyten unter oxidativem Stress und Hypoxie

In den folgenden Zellkulturexperimenten sollte untersucht werden, welchen Einfluß BMP2 auf adulte Rattenkardiomyozyten ausübt, die verschiedenen Stressbedingungen ausgesetzt sind.

Unter normalen Zellkulturbedingungen (Kontrollgruppe) zeigen vitale adulte Rattenkardiomyozyten eine stäbchenförmige Form (siehe Abbildung 14). Avitale Zellen haben durch Spaltung und Umorientierung ihrer intrazytoplasmatischen Elemente und den Verlust der Fähigkeit, auf Oberflächen zu haften, eine gedrungene, kugelige Zellform.



Abb.14: Lichtmikroskopische Darstellung einer Primärkultur adulter Rattenkardiomyozyten (Phasenkontrast).

Einfluss von oxidativem Stress bzw. Hypoxie auf Primärkulturen adulter Rattenkardiomyozyten.

Adulte Rattenkardiomyozyten, die unter normalen Bedingungen kultiviert werden (Kontrollgruppe), weisen auch nach 48-stündiger Inkubation eine stäbchenförmige Morphologie auf und zeigen eine gute Adhärenz an den Kulturschalen, bei der Quantifizierung finden sich im Mittel 219 ± 44 vitale Kardiomyozyten pro Gesichtsfeld. Im Vergleich hierzu zeigen Kardiomyozyten aus Zellkulturen, die in Gegenwart von $200 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ inkubiert werden, nach 48 Stunden deutliche Veränderungen. Zum einen ist zu erkennen, dass die Gesamtzahl an Kardiomyozyten deutlich reduziert ist. Des Weiteren unterscheidet sich auch der morphologische Zustand der verbliebenen Zellen von den unbehandelten Kontroll-Kardiomyozyten. Lichtmikroskopisch sind nur noch wenige stäbchenförmige Zellen erkennbar, der größte Teil der Zellen ist abgerundet und haftet nur noch teilweise auf den Kulturschalen, bei der Quantifizierung finden sich mit 27 ± 13 signifikant weniger vitale Zellen pro Gesichtsfeld.

Auch bei der Detektion apoptotischer Zellkerne mittels TUNEL-Assay können Unterschiede zwischen Kontroll- und H_2O_2 -behandelten Kulturen festgestellt werden. Während unter Kontrollbedingungen 19 ± 4 TUNEL-positive Zellkerne als Ausdruck der Apoptose pro Gesichtsfeld gezählt werden, lassen sich in den H_2O_2 -behandelten Kulturen mit 72 ± 10 TUNEL-positiven Zellkernen signifikant mehr apoptotische Zellen nachweisen.

Als weiteres Modell wurde die Inkubation der Kardiomyozyten unter Hypoxie in die Versuche einbezogen. Hierbei wurde der Sauerstoffgehalt im Inkubator auf 2% (statt 21%) reduziert. Die Inkubation unter Hypoxie führt nach 48 Stunden in den Zellkulturen zu deutlichen Veränderungen. Auch hier kommt es zu einer deutlichen Reduktion der Gesamtzellzahl an adhärennten Kardiomyozyten, und morphologisch sind nur noch wenige typische Stäbchenformen vitaler Zellen zu erkennen. Der überwiegende Teil der in den Kulturen vorhandenen Zellen ist abgerundet und haftet nicht mehr auf dem Boden der Kulturschalen. Die mikroskopische Quantifizierung zeigt, dass die Anzahl vitaler Kardiomyozyten auf 138 ± 38 pro Gesichtsfeld reduziert ist (Kontrolle: 219 ± 44).

Allerdings zeigt sich im TUNEL-Assay, dass die Anzahl apoptotischer Kardiomyozyten mit 22 ± 8 apoptotischer Zellkerne pro Gesichtsfeld sich nicht wesentlich von Kontrollkulturen unterscheidet (Abbildung 16).

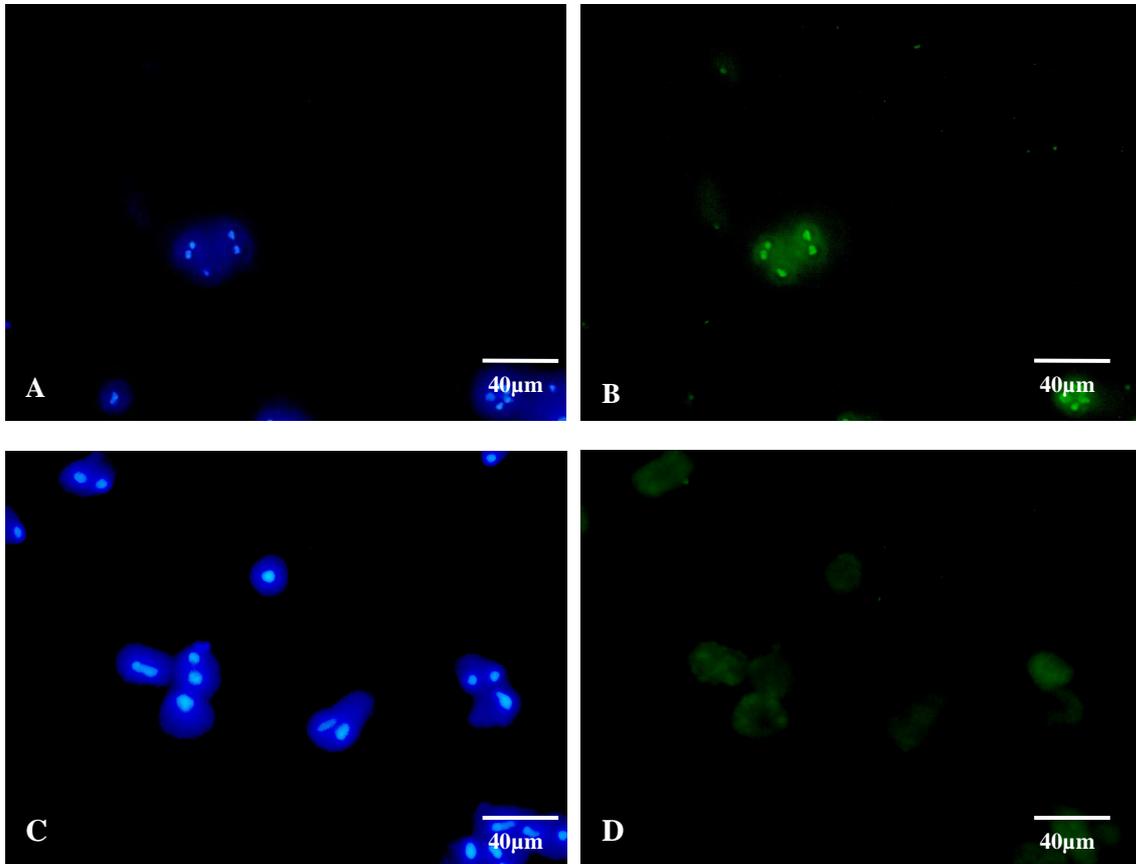
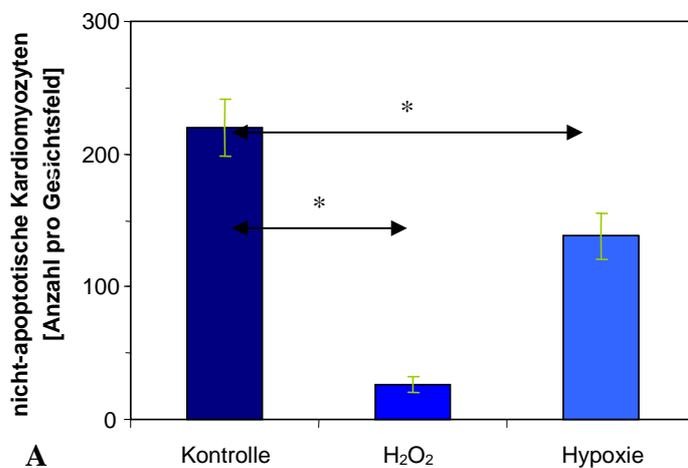


Abb.15: Zellkulturen adulter Rattenkardiomyozyten, lichtmikroskopische Darstellung, Fluoreszenzfärbung der Zellkerne mit Hoechst 33258 (A und C) und der apoptotischen Zellkerne mit TUNEL (B und D), Positivkontrolle der Färbung A) und B), Negativkontrolle der Färbung C) und D)



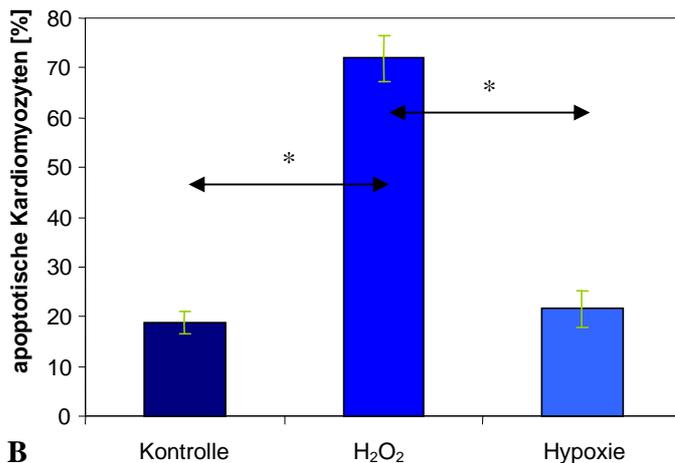


Abb.16: Einfluss verschiedener Inkubationsbedingungen auf das Überleben von adulten Rattenkardiomyozyten (Zellkultur). A): Mikroskopische Bestimmung der Anzahl nicht-apoptotischer Kardiomyozyten. B): Quantifizierung apoptotischer Kardiomyozyten mittels TUNEL-Assay, dargestellt ist der prozentuale Anteil TUNEL-positiver Zellkerne in den Kulturen. H₂O₂: 48 Stunden Inkubationszeit in Gegenwart von 200µM H₂O₂. Hypoxie: 48 Stunden Inkubation unter 2% Sauerstoff * p<0,05

Auswirkungen von BMP2 auf adulte Rattenkardiomyozyten in Gegenwart von H₂O₂

Um zu prüfen, ob BMP2 kultivierte Kardiomyozyten vor den negativen Auswirkungen von oxidativem Stress zu schützen vermag, wurden den Zellkulturen, die in Gegenwart von 200µM H₂O₂ inkubiert werden, BMP2 in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt. Es zeigt sich, dass die Gabe von BMP2 in den Zellkulturen zu einer Steigerung der Anzahl vitaler Zellen pro Gesichtsfeld führt. Dieser Effekt ist dosisabhängig und erreicht sein Maximum bei einem Zusatz von 80ng/ml BMP2. In diesen Zellkulturen können mit 72 ± 27 vitalen Zellen pro Gesichtsfeld im Vergleich mit den korrespondierenden Kulturen ohne BMP2 (27 ± 13) signifikant mehr intakte Kardiomyozyten nachgewiesen werden.

Des Weiteren wird erneut der prozentuale Anteil apoptotischer Kardiomyozyten bestimmt. Hier zeigt sich, dass sich mit steigendem Zusatz von BMP2 tendenziell die Anzahl der apoptotischen Kardiomyozyten pro Gesichtsfeld reduziert. Der maximale Effekt liegt auch hier bei einer BMP2-Konzentration von 80ng/ml: mit 43 ± 10 TUNEL-positiven Zellen pro Gesichtsfeld findet sich eine signifikante Reduktion der Apoptosen gegenüber der Kontrollsituation ohne BMP2 (72 ± 10 Apoptosen pro Gesichtsfeld; Abbildung 17).

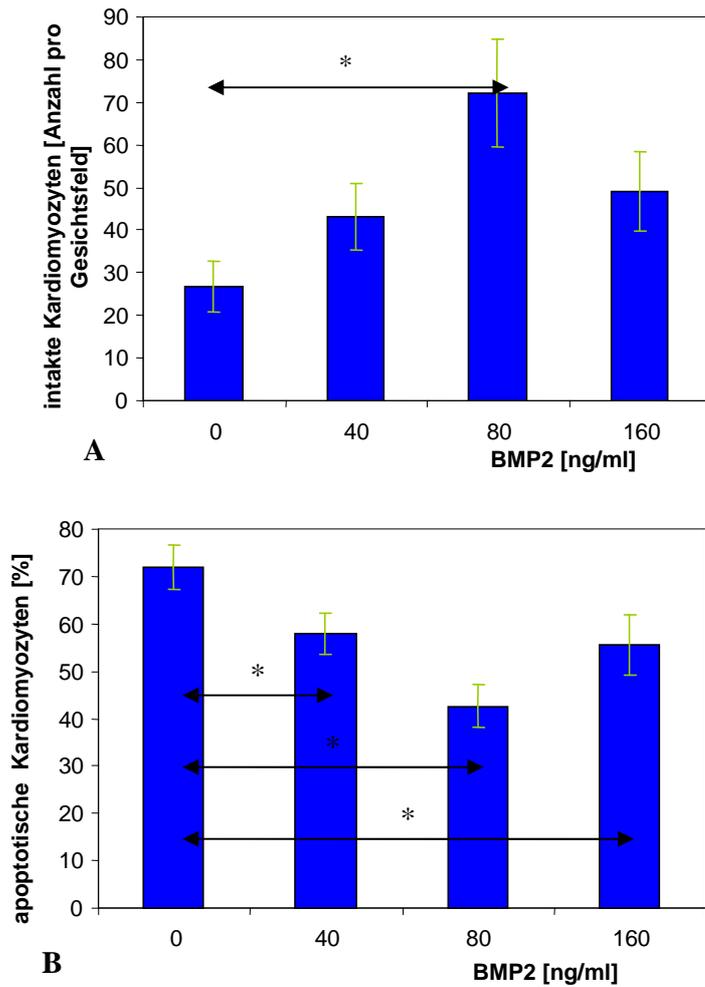
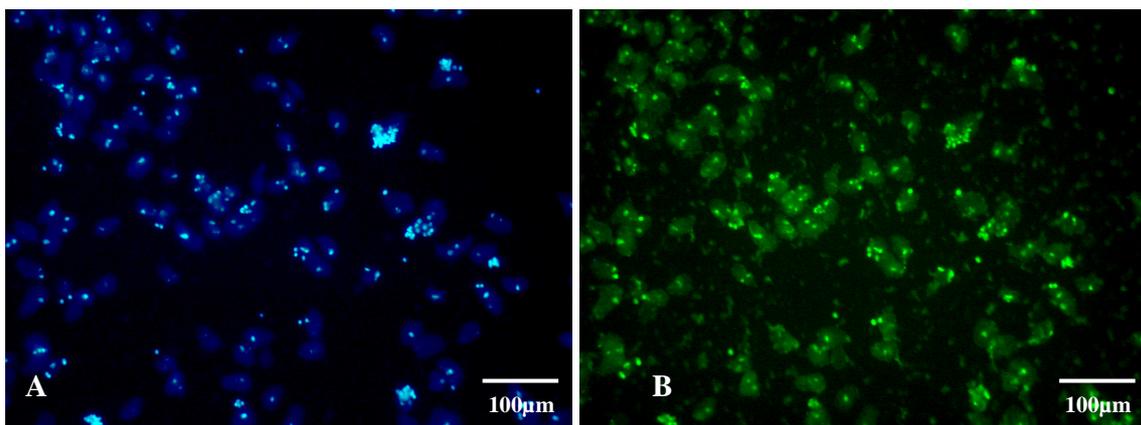


Abb.17: Einfluss steigender BMP2-Konzentrationen auf die Anzahl intakter (A) bzw. auf die Anzahl apoptotischer adulter Rattenkardiomyozyten (B) bei Inkubation in Gegenwart von 200 μ M H₂O₂ nach 48 Stunden Inkubationszeit (Zellkultur). * p<0,05



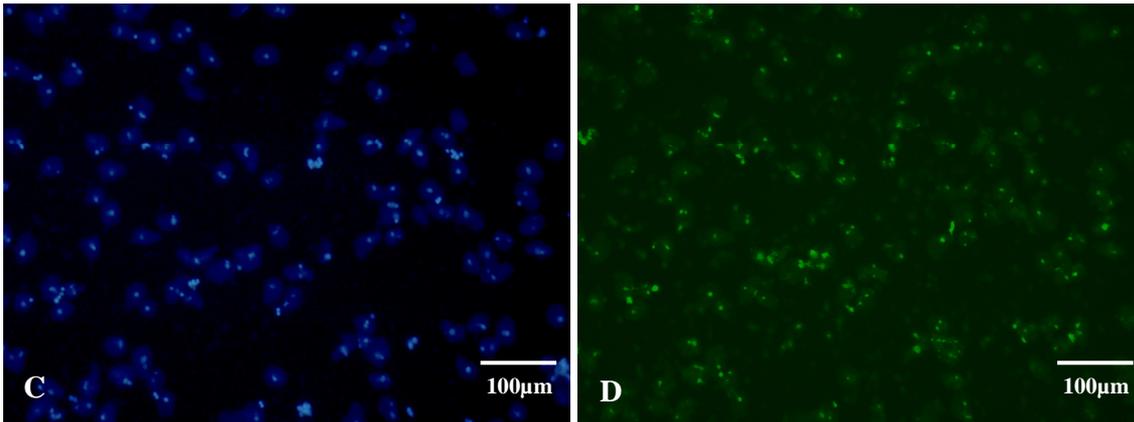
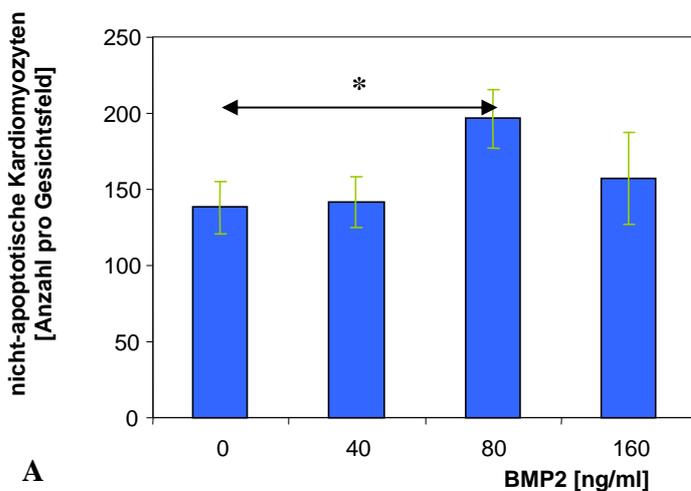


Abb.18: Zellkulturen adulter Rattenkardiomyozyten, lichtmikroskopische Darstellung, Fluoreszenzfärbung der Zellkerne mit Hoechst 33258 (blau) und der apoptotischen Zellkerne mit TUNEL (grün) bei Inkubation in Gegenwart von 200µM H₂O₂ nach 48 Stunden Inkubationszeit (Zellkultur). A und B ohne BMP2-Zusatz C und D mit 80ng BMP2

Wirkung von BMP2 auf adulte Rattenkardiomyozyten unter Hypoxie

Als nächstes wurde der Effekt von BMP2 auf die unter Hypoxie inkubierten Kardiomyozyten untersucht. Auch in diesen Versuchen zeigt BMP2 einen protektiven Effekt: dosisabhängig erhöht sich die Anzahl vitaler Kardiomyozyten unter dem Zusatz von BMP2. In dieser Versuchsreihe erweist sich das Wirkungsmaximum von BMP2 erneut bei einer Konzentration von 80ng/ml. Hier werden mit 196 ± 42 signifikant mehr vitale Zellen pro Gesichtsfeld nachgewiesen, als dies in den korrespondierenden Kontrollkulturen der Fall ist (138 ± 38 vitale Zellen pro Gesichtsfeld; Abbildung 19A).

Bereits zuvor hatte sich gezeigt, dass es bei der Inkubation unter Hypoxie nicht zu einem vermehrten Auftreten von Kardiomyozyten-Apoptosen kommt (siehe Abb. 16B). Auch die Zugabe von BMP2 hat unter diesen Bedingungen keinen Einfluß auf die Häufigkeit von Kardiomyozyten-Apoptosen (Abbildung 19B).



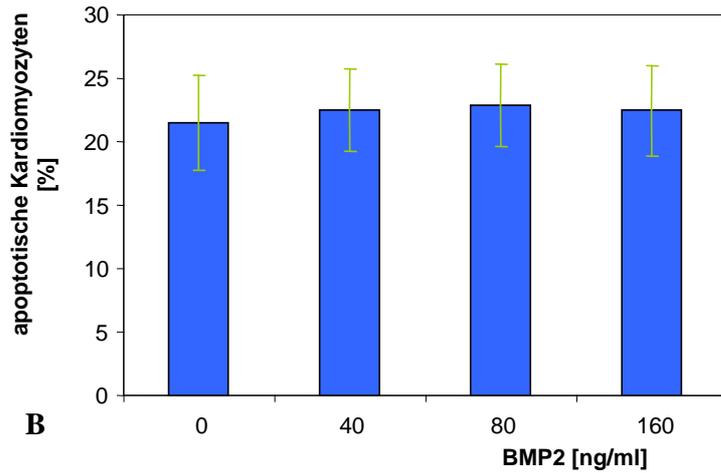


Abb.19: Einfluss steigender BMP2-Konzentrationen auf die Anzahl vitaler adulter Rattenkardiomyozyten (A) sowie die Häufigkeit von Kardiomyozyten-Apoptosen (B) bei Inkubation der Zellen unter Hypoxie für 48h. * $p < 0,05$

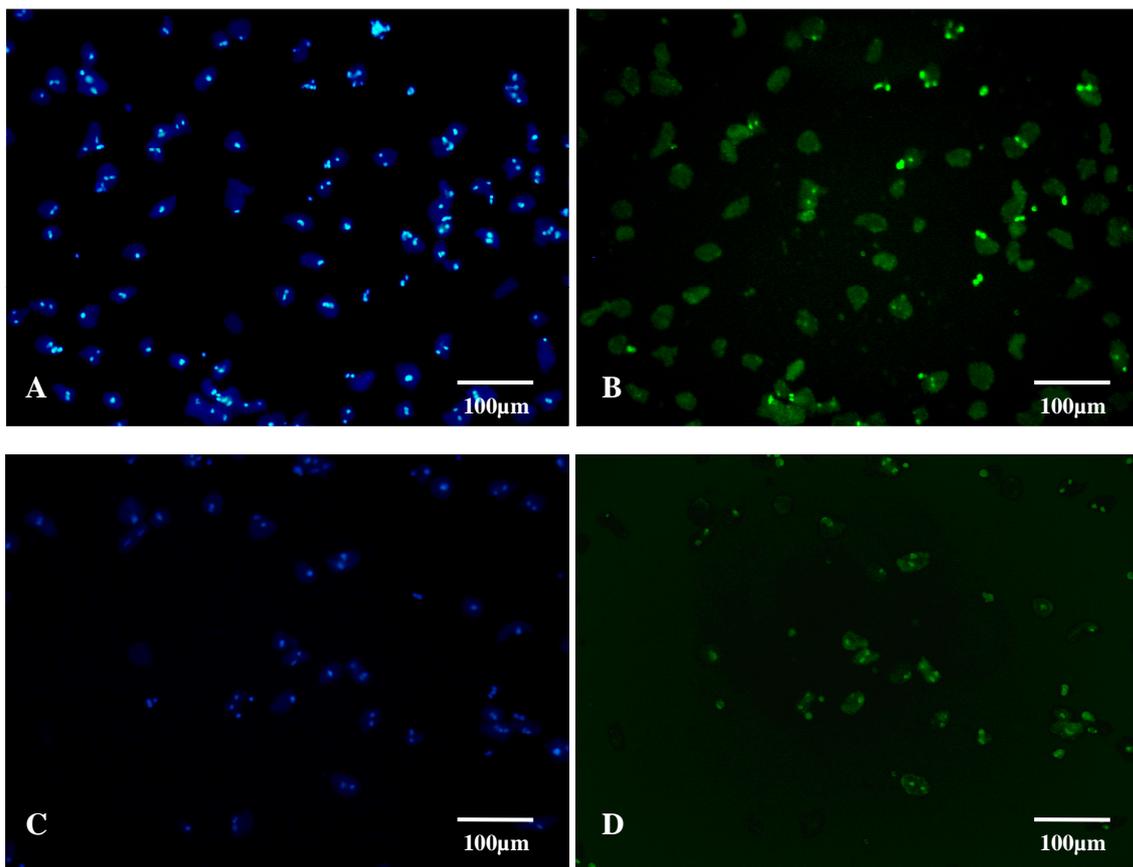


Abb.20: Zellkulturen adulter Rattenkardiomyozyten, lichtmikroskopische Darstellung, Fluoreszenzfärbung der Zellkerne mit Hoechst 33258 (blau) und der apoptotischen Zellkerne mit TUNEL (grün) bei Inkubation unter Hypoxie nach 48 Stunden Inkubationszeit (Zellkultur). A) ohne BMP2-Zusatz B) mit 80ng BMP2

4.3.2 Wirkung von BMP2 auf Kontraktilitätsparameter neonataler Rattenkardiomyozyten

Um zu prüfen, ob BMP2 Einfluss auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten nimmt, werden in Kulturen neonataler Rattenkardiomyozyten verschiedene Parameter der Kontraktilität und Relaxation der Myozyten unter steigenden BMP2-Konzentrationen untersucht. Die Versuche werden sowohl an spontan kontrahierenden als auch an elektrisch stimulierten Kardiomyozyten durchgeführt.

Spontan kontraktile Kardiomyozyten

Der Einfluss steigender BMP2-Konzentrationen auf die spontane Kontraktionsfrequenz sowie die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit der Einzelkontraktionen wird an spontan kontraktilem Rattenkardiomyozyten untersucht. In diesen Experimenten findet sich eine Kontraktionsfrequenz der Kardiomyozyten ohne Zusatz von BMP2 von 19 ± 2 Kontraktionen pro Minute, die Kontraktionsgeschwindigkeit der einzelnen Kontraktionen liegt bei $2,2 \pm 0,6$ AU (*arbitrary units*) und die Geschwindigkeit der Relaxation bei $1,3 \pm 0,3$ AU.

Die Zugabe von BMP2 zu den Zellkulturen erhöht signifikant die Schlagfrequenz der spontan kontraktilem Kardiomyozyten. Dies zeigt sich anhand der Abnahme der *beat-to-beat*-Intervalle und ist sowohl bei einer BMP2-Konzentration von 80ng/ml, als auch bei 160ng/ml BMP2 nachweisbar (Abb 21A).

Auch im Hinblick auf die Verkürzungsgeschwindigkeit der Myozyten bei der Aufzeichnung der einzelnen Kontraktionen wird tendenziell ein Effekt von BMP2 festgestellt. Während die unbehandelte Kontrollgruppe eine mittlere Kontraktionsgeschwindigkeit von $2,2 \pm 0,6$ AU zeigt, wird unter dem Einfluss von 80ng/ml BMP2 eine Steigerung auf $2,7 \pm 0,5$ AU und bei 160ng/ml auf $2,9 \pm 0,4$ AU beobachtet, allerdings sind die genannten Unterschiede nicht signifikant.

Ähnliche Effekte werden auch bei der Untersuchung der Relaxationsgeschwindigkeit festgestellt. Auch hier hat BMP2 in steigenden Konzentrationen einen positiven Einfluss auf die Relaxationsgeschwindigkeit spontan kontraktilem Kardiomyozyten. Die unbehandelte Kontrolle zeigt eine Relaxationsgeschwindigkeit von $1,3 \pm 0,3$ AU, der Zusatz von 80ng/ml BMP2 steigert die Geschwindigkeit auf $1,4 \pm 0,3$ AU und der von 160ng/ml BMP2 auf $1,6 \pm 0,3$ AU (Unterschiede nicht signifikant).

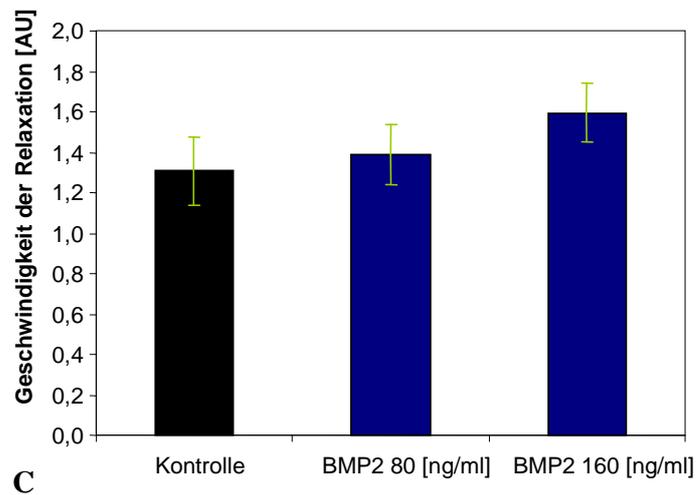
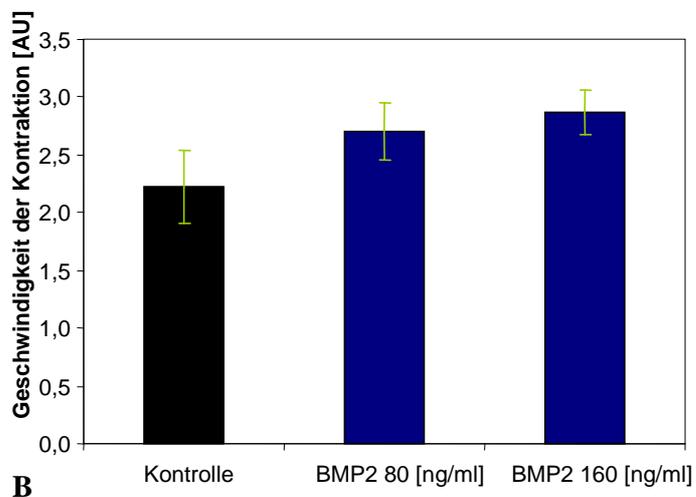
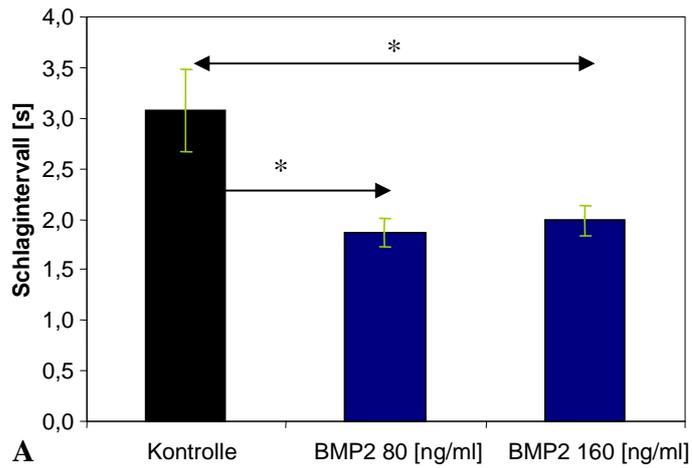


Abb.21: Einfluss steigender BMP2-Konzentrationen auf Kontraktilitätsparameter von spontan kontrahierenden isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten. A) Schlagintervall der spontanen Kontraktionen. (B) Geschwindigkeit der Einzelkontraktionen. (C) Relaxationsgeschwindigkeit.* $p < 0,05$

Kardiomyozyten unter elektrischer Stimulation (Pacing)

Für weitere Messungen werden die Kardiomyozyten-Kulturen durch die Anlage eines elektrischen Wechselfeldes zu Kontraktionen mit einer Frequenz von 2Hz (=120 Kontraktionen/min) angeregt, und erneut werden die durch den Zusatz steigender BMP2-Konzentrationen hervorgerufenen Änderungen des Kontraktions- und Relaxationsverhaltens beobachtet. Hierbei findet sich bei der unbehandelten Kontrollgruppe eine Geschwindigkeit der Einzelkontraktionen von $1,7 \pm 0,3$ AU. Unter dem Einfluss von BMP2 kommt es bei einem Zusatz von 80ng/ml zu einer signifikanten Steigerung der Kontraktionsgeschwindigkeit auf $2,5 \pm 0,7$ AU, bei 160ng/ml BMP2 findet sich ebenfalls eine signifikante Erhöhung auf $2,5 \pm 1,2$ AU (Abb. 22).

Ähnlich verhält es sich bei elektrisch stimulierten Kardiomyozyten für die Messung der Relaxationsgeschwindigkeit. Hier weisen die Kontrollkardiomyozyten eine Relaxationsgeschwindigkeit von $1,1 \pm 0,4$ AU auf, der Zusatz von BMP2 bewirkt eine Steigerung auf $1,6 \pm 0,5$ AU (80ng/ml BMP2) bzw. auf $1,5 \pm 0,6$ AU (160ng/ml BMP2), allerdings sind die gefundenen Unterschiede statistisch nicht signifikant.

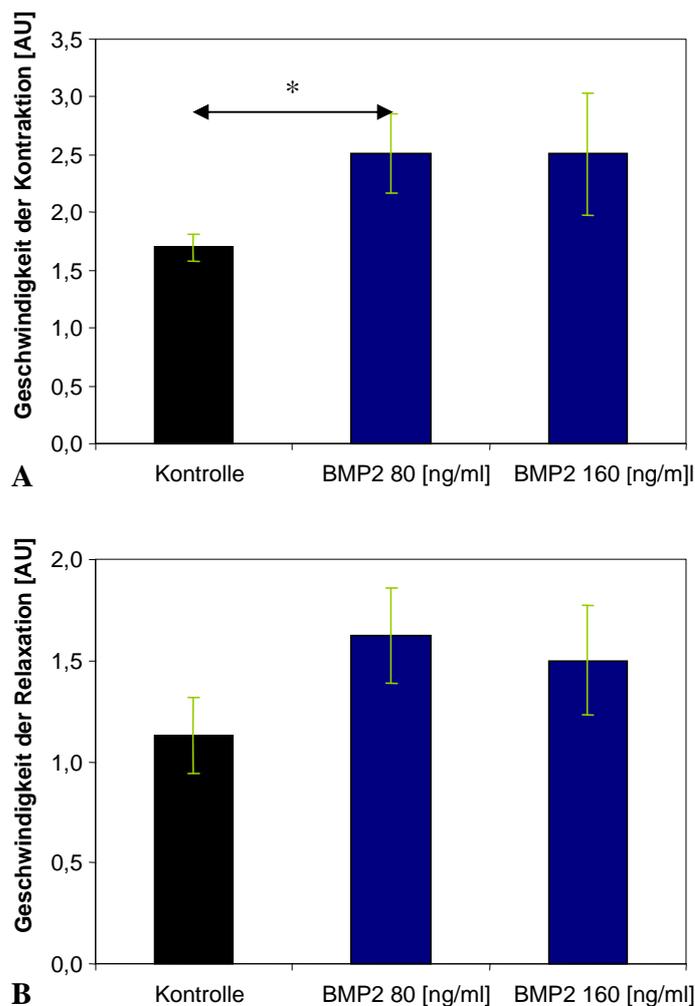


Abb.22: Einfluss steigender BMP2-Konzentrationen auf die Geschwindigkeit der Kontraktion elektrisch stimulierter Kardiomyozyten (A) sowie auf die Relaxationsgeschwindigkeit (B). (Zellkultur). *p < 0,05

5. Diskussion

Die koronare Herzkrankheit (KHK) mit ihrer wichtigsten Komplikation, dem akuten Myokardinfarkt, ist eine der Haupttodesursachen in den westlichen Industrienationen [98, 99]. Etablierte Methoden, welche zu einer schnellen Reperfusion des ischämischen Myokards führen, haben in den letzten Jahren zu einer Senkung der Letalität des AMI geführt [98-100]. Dennoch liegt sogar unter idealen Bedingungen zwischen der Infarkt diagnose und der kompletten Reperfusion des Myokards eine kritische Zeitspanne, in der es wünschenswert wäre, zusätzliche Verfahren zur Myokardprotektion einsetzen zu können.

Verschiedene Strategien der so genannten Präkonditionierung führen in tierexperimentellen Untersuchungen zu einer Verbesserung der myokardialen Ischämietoleranz [39, 40]. Unter Präkonditionierung versteht man die Vorbehandlung des Myokards entweder vor dem akuten Myokardinfarkt oder vor der kompletten Reperfusion des occludierten Gefäßes mit dem Ziel, die Ischämietoleranz des Gewebes zu verlängern und so den Verlust kontraktile Zellen zu minimieren. In diesem Rahmen wurden Substanzen wie IGF-1 und TGF- β im Hinblick auf ihre protektiven Effekte auf die Ischämietoleranz des Myokards und Schutz vor Reperfusionsschäden untersucht [40, 41]. So konnte z.B. die Arbeitsgruppe um M. Buerke in einem Ischämie-Reperfusionmodell bei Ratten kardioprotektive Eigenschaften des Wachstumsfaktors IGF-1 nachweisen [40]. In diesen Versuchen wurde Ratten vor Ischämieinduktion IGF-1 in verschiedenen Konzentrationen intravenös verabreicht. Es konnte am Ende der Versuchsreihen gezeigt werden, dass die myokardialen Schäden unter IGF-1-Applikation geringer waren als die der Kontrollgruppe. Eine weitere Arbeitsgruppe generierte transgene Mäuse (FVB.Igf+/-), welche in ihren Kardiomyozyten IGF-1 β überexprimieren [39]. Die Überexpression von IGF-1 schützte die Myozyten des lebensfähigen Myokards nach einem Infarkt vor dem Zelltod und minimierte Remodeling-Vorgänge. Allerdings wurde in dieser Versuchsreihe festgestellt, dass die Überexpression von IGF-1 zu einer Hypertrophie des Herzens führt. Daher scheint der theoretische Einsatz von IGF-1 für klinische Anwendungen limitiert zu sein. Als weiterer vielversprechender Kandidat für die Myokardprotektion wurde der Wachstumsfaktor *transforming-growth-factor* β (TGF- β) dahingehend untersucht, inwiefern er den negativen Einflüssen von Tumor-Nekrose-Faktor α und den bei oxidativem Stress entstehenden freien Radikalen bei myokardialer Ischämie und Reperfusion entgegenwirken kann [40]. TGF- β induzierte jedoch eine kardiale Fibrose und steigerte die Kardiomyozyten-Apoptosen, sodass auch hier der klinische Einsatz nicht möglich erscheint [41].

Weitere Studien haben jedoch Hinweise darauf ergeben, dass andere Mitglieder der TGF-Superfamilie, die *Bone morphogenetic proteins* (BMP), möglicherweise über antiapoptotische Eigenschaften verfügen, ohne eine Hypertrophie oder Fibrose des Herzens auszulösen [42, 43].

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Gabe von BMP2 die Apoptoserate neonataler Rattenkardiomyozyten nach Serum-Entzug reduziert [42]. In der zitierten Studie wurden

ventrikuläre neonatale Rattenkardiomyozyten unter Serumentzug über 48 Stunden mit und ohne BMP2-Zusatz kultiviert. Anschließend wurde mittels TUNEL-Assay sowie mit einem ELISA die Vitalität der Zellen untersucht. Für diese Versuche wurden neonatale Rattenkardiomyozyten zunächst für 24 Stunden in Medium 199 + 10% FCS (*fetal calf serum*) inkubiert. Für die folgenden 24 Stunden wurde der Serumanteil im Medium zunächst auf 1% reduziert, im Anschluss folgten 12 Stunden Inkubationszeit unter komplettem Serumentzug. Nach Ablauf dieser Inkubationsphase wurde den Zellkulturen BMP2 zugefügt, und die Zellen wurden über weitere 48 Stunden kultiviert, bevor sie lysiert und analysiert wurden. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass BMP2 die durch den Serumentzug induzierte Fragmentation der DNA signifikant reduzierte, und im TUNEL-Assay wurden in den mit BMP2 behandelten Zellkulturen signifikant weniger apoptotische Zellen nachgewiesen als in den Kontrollkulturen. Weiterhin wurde in dieser Arbeit über eine Westernblot-Analyse nachgewiesen, dass BMP2 bei Kardiomyozyten nach acht Stunden Serumentzug zu einer raschen und dosisabhängigen Phosphorylierung von Smad 1 führt, wobei der maximale Effekt bei einer BMP2-Konzentration von 80ng/ml beobachtet werden konnte. Weiterhin wurde belegt, dass bei höheren Smad 1-Spiegeln die Apoptoseraten sanken. Diese Arbeit zeigte außerdem, dass BMP2 und Smad 1 die Expression des antiapoptotischen Proteins bcl-xL in neonatalen Rattenkardiomyozyten erhöhen: der Zusatz von 80ng/ml BMP2 bewirkte in den Zellkulturen einen deutlichen Anstieg der mRNA von bcl-xL, mit einem maximalen Anstieg 24 Stunden nach BMP2-Applikation. Auch auf Proteinebenen konnte bcl-xL in gesteigerter Konzentration nach BMP2-Applikation in dieser Versuchsreihe mittels Westernblot-Analyse in Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Zusammenfassend belegt diese Arbeit somit, dass die Gabe von BMP2 durch Aktivierung von Smad 1 und bcl-xL der durch Serum-Entzug induzierten Apoptose von neonatalen Kardiomyozyten entgegenwirkt. Einschränkend muss jedoch konstatiert werden, dass Aussagen zu einer möglicherweise existierenden protektiven BMP2-Wirkung gegenüber oxidativem Stress oder Hypoxie - pathophysiologisch eher relevanten Situationen - nicht getroffen und dass alle Untersuchungen ausschliesslich an neonatalen, nicht jedoch an adulten Zellen vorgenommen wurden.

Des weiteren finden sich in der Literatur Angaben, dass die Aktivierung des BMP-Signalweges in Kardiomyozyten zur Reduktion der myokardialen Schädigung nach Ischämie-Reperfusion führt [101]. Durch Experimente mit transgenen Mäusen, die Smad 1 kardiomyozyten-spezifisch überexprimieren (aMHC-Smad1), wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass die Aktivierung des Smad 1-Signalweges zu kardioprotektiven Effekten führt. Unter Kontrollbedingungen zeigten die Smad 1-transgenen Mäuse bei der echokardiographischen und histologischen Untersuchung der Herzen keine pathologischen Veränderungen im Vergleich mit dem Wildtypstamm. In einer Serie von Experimenten wurde bei diesen Tieren durch Ligatur der LAD für eine Stunde eine Myokardischämie, gefolgt von einer Stunde Reperfusion, induziert, als Kontrollgruppe kamen altersgleiche Wildtyptiere zum Einsatz. Die folgenden Untersuchungen bezüglich der Apoptoseraten

im Infarktgebiet mittels TUNEL-Assay und DNA-Laddering zeigten signifikant weniger apoptotische Zellen in den Herzen der transgenen Tiere. Weiterhin wurden die Herzen mittels Western-Blot auf die Menge an Smad 1 und bcl-xL hin untersucht. Auch hier wiesen die generierten transgenen Tiere signifikant höhere Konzentrationen der genannten Proteine auf, als dies bei korrespondierenden Wildtypen zu beobachten war. Begleitende Zellkulturexperimente wurden an neonatalen Rattenkardiomyozyten durchgeführt. Es wurden Hypoxie und Reperfusionstudien an nativen Rattenkardiomyozyten mit und ohne BMP2-Zusatz durchgeführt. Außerdem wurden Rattenkardiomyozyten mit dem adenoviralen Smad 1-Vector (Ad-Smad 1) infiziert, um eine gesteigerte Smad 1-Expression in diesen Zellen zu generieren. Dem Nährmedium der nativen Zellkulturen wurde BMP2 zugesetzt und die Zellen für 12 Stunden in diesem Medium kultiviert. Anschließend wurden diese Zellkulturen für 24 Stunden unter Hypoxie kultiviert, gefolgt von fünf Stunden Oxygenierung. Es wurde beobachtet, dass es bereits 15 Minuten nach BMP2-Applikation zu einem signifikanten Anstieg von phosphorylierten Smad 1 in den Kardiomyozyten kam und dass nach Reoxygenierung der Zellen unter BMP2 erneut ein Anstieg der so detektierten Smad 1-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Eine BMP2-Applikation bei Hypoxie ohne anschließende Oxygenierung zeigte keine protektiven Effekte. Ähnliche Versuche wurden auch mit den adenoviral transduzierten Zellen durchgeführt. Hier wurde gezeigt, dass 12 Stunden nach adenoviraler Infektion mit Ad-Smad 1 eine Phosphorylierung von Smad 1 stattfindet. Auch kam es zu einer Steigerung der bcl-xL und β -Catenin-Expression sowie einer Reduktion der Caspase 3-Aktivität, was übereinstimmend als Zeichen einer antiapoptotischen Wirkung interpretierbar war. Zusammenfassend wurde in dieser Studie somit festgestellt, dass sowohl der Zusatz von BMP2 zum Nährmedium bei neonatalen Kardiomyozyten als auch die Überexpression von Smad 1 das Kardiomyozytenüberleben nach Hypoxie und anschließender Reoxygenierung signifikant verbessern und die Apoptoseraten senken kann [101].

Vor dem Hintergrund dieser Daten soll im Rahmen der eigenen Arbeit untersucht werden, inwiefern die pharmakologische Gabe von BMP2 im chronischen Infarktmodell bei Mäusen ebenfalls zu protektiven Effekten führt und durch welche Mechanismen dies ggf. zu erklären wäre.

Das für die Untersuchungen verwendete BMP2 wurde in dem Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg rekombinant hergestellt [89]. In früheren Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass das so hergestellte BMP2 biologische Aktivität besitzt [89]: bei *in vivo* Versuchen mit Ratten zeigte das rekombinant hergestellte BMP2 ein osteoinduktives Potential. In den eigenen Zellkulturexperimenten wird über die Induktion des Enzyms Alkalische Phosphatase die biologische Aktivität des verwendeten BMP2 erneut bestätigt und im untersuchten Konzentrationsbereich eine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung nachgewiesen. Hierfür wird ein etablierter und in zahlreichen früher publizierten Studien verwendeter Assay angewendet [102]: als Knochenbildung-stimulierender Wachstumsfaktor induziert BMP2 auch in Fibroblasten die Aktivierung knochentypischer Enzyme, so dass die biologische Aktivität von BMP2 über die

Induktion der Alkalischen Phosphatase bestimmt werden kann [52, 53, 102]. Der BMP2-Aktivitätstest zeigt, dass das verwendete BMP2 erwartungsgemäß eine konzentrationsabhängige Steigerung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase in NIH 3T3-Zellen bewirkt.

Als zentraler Bestandteil der eigenen Arbeit soll in einem *in-vivo* Modell mit adulten ICR-Mäusen der Einfluss von BMP2 auf das Überleben der Versuchstiere und die kardialen Umbauvorgänge nach Induktion eines Myokardinfarktes durch Ligatur der LAD untersucht werden. Hierzu erfolgt zunächst eine echokardiographische Untersuchung der Versuchstiere vor dem operativen LAD-Verschluss, um später diese Werte mit den echokardiographischen Untersuchungen 21 Tage nach der Infarkt-Induktion vergleichen zu können. Vor Induktion des Myokardinfarktes beträgt der enddiastolische linksventrikuläre Innendiameter (LVIDD) $4,4 \pm 0,1$ mm. In der Literatur finden sich als Vergleichswerte für adulte CD1- bzw. ICR-Mäuse sehr ähnliche Angaben (zwischen $4,19 \pm 0,03$ mm und $4,23 \pm 0,48$ mm [103-105]). Die 21 Tage nach dem Myokardinfarkt gemessenen enddiastolischen LV-Diameter betragen in der mit PBS behandelten Versuchsgruppe $5,7 \pm 0,1$ mm und in der mit BMP2 behandelten Gruppe $5,6 \pm 0,2$ mm. In der Literatur wird berichtet, dass die progressive Dilatation des linken Ventrikels nach LAD-Verschluss bis zwei Wochen nach dem Infarkt rapide voranschreitet, während später der Ventrikeldurchmesser nahezu konstant bleibt [106]. Die in der Literatur vier Wochen nach dem Infarkt bei CD-1 Mäusen gemessenen LVIDD zwischen $5,5 \pm 0,2$ mm bis $6,2 \pm 0,1$ mm können somit als Vergleichsmaß herangezogen werden [92, 107, 108]. Übereinstimmend sind die Ventrikel der eigenen Versuchstiere nach dem Infarkt im Vergleich mit den präoperativ erhobenen Werten der gesunden Kontrolle deutlich dilatiert und mit den andernorts beschriebenen Werten nach LAD-Verschluss vergleichbar.

Bei den echokardiographischen Untersuchungen finden sich erwartungsgemäß erhebliche Unterschiede zwischen den beiden Infarktgruppen (PBS, BMP2) im Vergleich mit der Kontrollgruppe der scheinoperierten Tiere: der chronische Verschluss der LAD schlägt sich in einer Dilatation des linken Ventrikels sowie einer Abnahme der Pumpfunktion (FS, EF, FAC) nieder. Die Behandlung der Infarkt-Tiere mit PBS oder BMP2 führt jedoch zu keinen Unterschieden hinsichtlich der echokardiographisch bestimmten Parameter der linksventrikulären Geometrie oder Pumpleistung. Allerdings unterscheiden sich die beiden Infarktgruppen bezüglich der Herzfrequenz: hier lässt sich sowohl eine signifikante Steigerung der Schlagfrequenz beider Infarktgruppen gegenüber den präoperativ erfassten Kontrolldaten erkennen, darüber hinaus findet sich eine signifikant höhere Herzfrequenz der BMP2-Gruppe gegenüber der PBS-Gruppe.

Die höheren Herzfrequenzen der Infarktgruppen gegenüber der Kontrollgruppe ergeben sich durch physiologische Kompensationsmechanismen, bei denen die schlechte linksventrikuläre Funktion mit einem Abfall des Schlagvolumens durch eine Steigerung der Herzfrequenz ausgeglichen werden soll, um so dem drastischen Abfall des Herzzeitvolumens entgegenzuwirken und eine adäquate Versorgung der Peripherie zu gewährleisten. Eine weitere Zunahme der Herzfrequenz unter BMP2-

Behandlung im Vergleich zur PBS-Gruppe stellt somit einen Hinweis darauf dar, dass nach BMP2-Gabe die Infarkt-Ausdehnung größer sein könnte als in der PBS-Gruppe. Ein direkter (pharmakologischer) Effekt des BMP2 auf die Herzfrequenz ist dagegen nicht anzunehmen, da die echokardiographischen Untersuchungen und damit auch die Messung der Herzfrequenz erst 21 Tage nach der BMP2-Gabe erfolgt sind.

Der Nachweis einer unterschiedlichen Herzfrequenz der Versuchstiere bei den echokardiographischen Untersuchungen könnte jedoch für die Bestimmung der Kontraktilitätsparameter von Bedeutung sein, da das Herz im physiologischen Bereich die Erhöhung der Herzfrequenz mit einer Steigerung der Kontraktilität beantwortet (sog. Bowditch- oder Treppen-Phänomen).

In der eigenen Arbeit wird den Versuchstieren 30 min vor der Ligatur der LAD eine Injektion von BMP2 bzw. PBS verabreicht. Die Auswertung des Überlebens der Tiere zeigt, dass BMP2 das Survival der Mäuse in der Akutphase des Infarktes (24 Stunden nach LAD-Verschluss) verbessert. Nach Angaben in der Literatur versterben zwischen 7-32% der Mäuse innerhalb der ersten 24 Stunden nach einem induzierten Infarkt [106, 109, 110], weitere 15% in den folgenden drei Tagen und nochmals weitere 19-40% innerhalb der ersten Woche nach dem Infarkt ereignis [106, 109, 110]. Bei den Untersuchungen der eigenen Versuchsreihe versterben innerhalb der ersten 24 Stunden 38% der Tiere der mit PBS behandelten Kontrollgruppe. Weitere 12% versterben innerhalb der ersten drei Tage nach dem LAD-Verschluss. Zu einem späteren Zeitpunkt verstarb kein Tier dieser Versuchsgruppe. Diese Werte sind mit den in der Literatur angegebenen Zahlen vergleichbar und spiegeln die übliche Letalität nach LAD-Ligatur bei Mäusen wieder.

In der BMP2 Versuchsgruppe versterben im Vergleich lediglich 14% der Tiere innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Infarkt, in den folgenden Tagen gleicht sich dieser Unterschied jedoch weitgehend den zuvor beschriebenen Relationen an (Versterben von 18% der Tiere innerhalb der ersten 3 Tage; weitere 7% innerhalb der folgenden Wochen). Dieses Ergebnis zeigt, dass innerhalb der eigenen Versuchsreihe die Applikation von BMP2 zu einer akuten Reduktion der Letalität innerhalb der ersten 24 Stunden im Infarktmodell der Maus bewirkt. Die 21-Tage-Letalität nach LAD-Verschluss beträgt in der BMP2 Versuchsgruppe 33%, in der Kontrollgruppe 46%; dieser Unterschied ist jedoch aufgrund der begrenzten Anzahl von Versuchstieren nicht mehr signifikant.

Die Größe und Ausdehnung der entstandenen Myokardinfarkte wird anhand histologischer Gewebeschnitte untersucht.

Bereits 1979 konnte von Pfeffer et al. bei Ratten gezeigt werden, dass Infarktgrößen, welche weniger als 30% der linksventrikulären Zirkumferenz ausmachen, zu keinem langfristig detektierbaren Funktionsverlust des linken Ventrikels führen [111]. Erst ab einem Verlust von mehr als 30% der funktionellen Myokardmasse konnte in die zitierten Untersuchungen eine anhaltende und progrediente Einschränkung der linksventrikulären Funktion festgestellt werden (erniedrigter systolischer Blutdruck, erniedrigter arterieller Mitteldruck, verlängerte Auswurfzeit). Liegt der

Verlust bei mehr als 46%, tritt eine Stauungsinsuffizienz in Ruhe auf, erkennbar an einem erhöhten rechts- und linksventrikulären Füllungsdruck, einer verminderten Ejektionsfraktion und einer herabgesetzten Minuten-Volumen-Arbeit [111]. Daher ist es wichtig, in tierexperimentellen Untersuchungen bei kleinen Nagern reproduzierbar eine Ischämie von mindestens 30% des linken Ventrikels zu induzieren, wenn Auswirkungen auf chronische Infarkt-bedingte Umbauvorgänge des Herzens untersucht werden sollen.

Nach einem Verschluss der LAD, welche die Vorderwand des linken Ventrikels unter Einschluss des Apexbereiches versorgt, kommt es bei Nagern in Abhängigkeit der Höhe des Verschlusses zu einem unterschiedlich großen Verlust an Myokard. So finden sich auch in der Literatur unterschiedliche Angaben bezüglich der Größe der induzierten Infarkte, welche in den Angaben von 8 bis 65% der linksventrikulären Zirkumferenz im Mausmodell variieren (Übersichten in [91, 112, 113]).

Im Jahr 2004 wurde von N. Degrabiele eine experimentelle Arbeit durchgeführt, in der die für standardisierte Versuche im Mausmodell optimale Ligaturhöhe der LAD zur Induktion großer, transmuraler Infarkte ermittelt werden sollte [113]. Die hohe Ligatur am atrioventrikulären Übergang führte zwar verlässlich zu sehr großen transmuralen Infarkten, war aber auch mit einer signifikant erhöhten Letalität der Versuchstiere vergesellschaftet. Eine Ligatur 3mm distal des atrioventrikulären Überganges induzierte große transmurale Infarkte, wies aber eine deutlich bessere Überlebensrate der Versuchstiere auf. Die im Rahmen der eigenen Experimente gewählte Ligaturhöhe liegt in etwa an diesem als optimale Ligaturstelle definierten Punkt, so dass durch die Occlusion der LAD reproduzierbar Infarkte induziert werden, welche mehr als 30% des linken Ventrikels ausmachen. So beträgt in den eigenen Experimenten die Infarktgröße der PBS-Kontrollgruppe $46\% \pm 9\%$ des linksventrikulären Myokards.

Im Rahmen der eigenen Arbeit wird festgestellt, dass die Tiere der BMP2 Behandlungsgruppe, die bis zum Ende des Versuches (21 Tage nach LAD-Verschluss) überleben, signifikant größere Infarkte aufweisen als die Tiere, denen lediglich die Trägersubstanz PBS vor dem LAD-Verschluss intravenös injiziert wurde ($61 \pm 8\%$ gegenüber $46\% \pm 9\%$). Übereinstimmend hierzu zeigt sich bei der Betrachtung der Herzgewichte der Versuchstiere, dass die Herzen der BMP2-Behandlungsgruppe tendenziell mit 300 ± 2 mg etwas schwerer sind als die der PBS-Vergleichsgruppe (280 ± 1 mg). Dieses Ergebnis erscheint auf den ersten Blick paradox, da anhand der Überlebens-Analyse dokumentiert ist, dass mehr Tiere der BMP2-Gruppe das akute Infarktereignis überleben. Es hätte somit vermutet werden können, dass die Infarkte der mit BMP2 behandelten Mäuse eine geringere Ausdehnung haben und die Tiere daher nicht an einem akuten kardiogenen Schock versterben – und sich so das signifikant bessere Überleben in den ersten 24 Stunden nach der Operation erklärt. Allerdings kann diese Hypothese aufgrund der histologischen Aufarbeitung der Herzen nicht aufrechterhalten werden. Da die LAD-Ligatur bei beiden Gruppen aufgrund der Verblindung identisch vorgenommen wurde, kann davon ausgegangen werden, dass

die „*Area at risk*“ zwischen den Gruppen vergleichbar gewesen ist. Die Befund-Konstellation von einem verbesserten Überleben der akuten Infarktphase einerseits bei einer andererseits signifikant größeren Infarktausdehnung innerhalb der überlebenden Versuchstiere legt daher die Schlussfolgerung nahe, dass nach BMP2-Behandlung offenbar auch Tiere mit relativ großen Infarkten die Akutphase des AMI überlebt haben, wohingegen Tiere der PBS-Gruppe mit vergleichbar großen Infarkten verstorben sind. Daher ist die mittlere Infarktgröße bei den überlebenden Tieren der BMP2-Versuchsgruppe größer als die in der PBS-Gruppe.

Diese Beobachtung macht deutlich, dass BMP2 das Überleben der Versuchstiere besonders bei großen transmuralen Infarkten verbessert und offenbar das Risiko, an einem kardiogenen Schock zu versterben, herabsetzt. Weiterhin weist die Kaplan-Mayer-Analyse darauf hin, dass eine einmalige Injektion von BMP2 30 Minuten vor dem LAD-Verschluss keinen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit des Versterbens der Tiere um den dritten und vierten Tag nach dem Infarkt ereignis nimmt.

Echokardiographisch hätte erwartet werden können, dass die Herzen der mit BMP2 behandelten Mäuse aufgrund der histologisch nachgewiesenen größeren Infarktausdehnung auch größere linksventrikuläre Durchmesser aufweisen, da das Ausmaß des Remodelings und damit der progressiven Dilatation nicht nur von der Lokalisation, sondern entscheidend auch von der Größe des Infarktes abhängig ist [15-17, 106]. Dieses Ergebnis lässt zwei unterschiedliche Interpretationen zu. Zum einen könnten relativ geringe Unterschiede aufgrund von methodisch bedingten Messungenauigkeiten der echokardiographischen Detektion entgehen, zum anderen könnte durch eine funktionelle Kompensation *in vivo* die Dilatation tatsächlich geringer ausgeprägt sein als dies allein aufgrund der Infarktgröße zu erwarten wäre.

Am wahrscheinlichsten ist ein kombiniertes Auftreten beider Hypothesen.

Nach einem Myokardinfarkt laufen in den geschädigten Herzen komplexe Umbau- und Anpassungsvorgänge ab, die als „*adverse remodeling*“ bezeichnet werden und zu denen auch die Entwicklung einer Hypertrophie zählt [13, 14, 21, 114]. Der Begriff des kardialen Remodelings wurde ursprünglich ausschließlich zur Beschreibung der Veränderungen im Herzen nach einem AMI benutzt [115]. Dabei beschreibt der Begriff „*Remodeling*“ im eigentlichen Sinne eine Umstrukturierung und Umverteilung von Gewebebestandteilen, die physiologischerweise in dem sich verändernden Gewebe bereits vorhanden sind. Diese Veränderungen sind keinesfalls immer an ein pathologisches Geschehen geknüpft, sondern erfolgen auch im Sinne einer physiologischen Anpassungsreaktion und sind als ein bedingt reversibles Geschehen zu betrachten [13, 115]. Daher wird der Begriff des kardialen Remodelings heute auch für die Beschreibung der Veränderungen am Herzen eingesetzt, bei denen andere Ursachen als ein Myokardinfarkt zugrunde liegen, wie z.B. der adaptiven Hypertrophie bei Mehrbelastung [13, 115]. Das Remodeling kann je nach Ursache symmetrisch oder asymmetrisch verlaufen. Ein Beispiel für ein symmetrisches Remodeling ist die

konzentrische Belastungshypertrophie, wie sie z.B. beim „Sportlerherz“ auftritt. Das durch einen akuten Myokardinfarkt ausgelöste Remodeling ist dagegen ein asymmetrischer Prozess, welcher sowohl das infarzierte Gebiet, als auch das infarktferne Myokard betrifft. Getriggert wird das kardiale Remodeling durch eine mechanische Dehnung der Myozyten, meist in Kombination mit weiteren Faktoren, wie einer persistierenden Ischämie, verschiedenen Hormonen oder vasoaktiven Peptiden, welche den mechanischen Faktor modifizieren [13, 115].

Die nekrotischen Herzmuskelzellen des Infarktgebietes bewirken schon während der ersten 24 Stunden nach dem akuten Infarktereignis eine Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, wie z. B. TNF- α , IL-1 β und IL-6, sowie die Bildung freier Radikale. Es folgt die Einwanderung von Neutrophilen und Makrophagen, welche das nekrotische Zellmaterial resorbieren. Schon während dieses Vorganges, noch bevor die Narbenbildung durch Fibroblastenproliferation und Kollagenablagerung beginnt, kann die erste Phase des Remodelings beobachtet werden. Diese Phase ist vor allem durch die Infarktexpansion geprägt, eine Dilatation des infarzierten Gewebes, welche nicht durch eine weitere Nekrotisierung von Myokard ausgelöst wird. Dieser Vorgang wurde erstmals 1978 von Hutchin und Bulkley beschrieben und beruht auf einem Auseinanderweichen von Muskelfasern aufgrund der Verminderung vitaler Myozyten im infarzierten Gebiet [116]. Besonders ausgeprägt ist dieser Vorgang in den apikalen Regionen des linken Ventrikels [13, 15-17, 115]. Während des weiteren Heilungsverlaufes dringen dann Bindegewebszellen in das Myozytenkompartiment vor, verbinden die separierten Muskelfasern und verleihen der entstehenden Narbe Festigkeit. Es kommt zu einer extensiven Proliferation von Fibroblasten und zur Anregung der Kollagensynthese [23, 24]. Je nach Spezies dauert der Vorgang der Narbenbildung zwischen Wochen und Monaten an [18]. Bei Mäusen konnte beispielsweise zwischen dem siebten und vierzehnten Tag nach einem Infarkt eine massive Fibroblastenproliferation und Kollagensynthese nachgewiesen werden, welche erst nach ca. zwei Monaten stabile Werte und damit wahrscheinlich das Ende der ‚Heilungsphase‘ erreicht [106].

Durch den Verlust von Kardiomyozyten entsteht ein akinetischer Wandabschnitt, was akut zu einer Mehrbelastung und Überdehnung des noch funktionsfähigen Myokards und einer Änderung der systolischen und diastolischen Druckverhältnisse führt [14]. Diese Veränderungen betreffen daher nicht nur das eigentlich durch die Ischämie betroffene Myokardareal, sondern führen auch zu Veränderungen in infarkt-fernen Regionen, dem Remodeling des „*remote myocardium*“. Als Reaktion auf die veränderte hämodynamische Situation erfolgt eine neurohormonale Aktivierung und die Freisetzung lokaler autokriner trophischer Faktoren [21]. Durch die gesteigerte Wandspannung werden Barorezeptoren auf der Myozytenoberfläche aktiviert, und es kommt zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten, was zu einer Zellvolumenzunahme von bis zu 73% (keine Angaben zu Standardabweichung etc.) führen kann [18]. Durch die Hypertrophie nimmt unter anderem die Wanddicke zu. Nach dem Laplace’schen Gesetz, welches besagt, dass die Wandspannung bei gleichem Radius und Innendruck durch eine vermehrte Wanddicke abnimmt,

wird durch die Hypertrophie somit eine erhöhte Wandspannung kompensatorisch reduziert. Als negative Folgen der Kardiomyozytenhypertrophie ist die Entwicklung der ventrikulären Hypertrophie zu nennen, welche zu einer „diastolic stiffness“ mit verminderter diastolischen Füllung führt und auch eine Einschränkung der systolischen Pumpfunktion nach sich zieht. Außerdem ist die Koronarreserve deutlich vermindert und es besteht eine höhere Prävalenz für die Entwicklung ventrikulärer Rhythmusstörungen [117].

Auch die Struktur des Bindegewebes zwischen den Kardiomyozyten wird im Rahmen des Remodelings verändert, und es kann eine gesteigerte Fibrosierung beobachtet werden [13, 15, 18, 115, 118, 119]. Diese wird unter anderem durch die lokale Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems mit einer Steigerung des Angiotensin II- und Aldosteron-Spiegels im Herzgewebe induziert [13, 115]. Versagen die Kompensationsmechanismen der funktionsfähigen Muskulatur, führt die dauerhafte Erhöhung des AT II- und Aldosteronspiegels zu einer interstitiellen und perivaskulären Fibrose. Folge hiervon ist sowohl eine Versteifung des Myokards mit der Konsequenz einer Relaxationsstörung, als auch eine Verlängerung der Diffusionsstrecke zwischen Kapillaren und Zellen, was eine vermehrte Ischämie neigung bedeutet [13, 115] und die Gefahr einer weiteren Abnahme der Herzfunktion beinhaltet.

In der eigenen Arbeit werden die Querschnittsflächen der Myozyten im Bereich des nicht infarzierten *Septum interventriculare* als ein Parameter des Remodelings, der die Hypertrophie des *remote myocardium* widerspiegelt, untersucht.

Yang et al. [106] beschrieb Myozytenquerschnittsflächen bei 10-12 Wochen alten, männlichen C57BL/6J-Mäusen einen Monat nach Ligatur der LAD von im Mittel $290\mu\text{m}^2$ und in der Kontrollgruppe ohne Myokardinfarkt von $150\mu\text{m}^2$ (keine Angaben zu Standardabweichung etc.). Die Arbeitsgruppe um LaPointe et al. [120] hat bei 12 Wochen alten, männlichen C57BL/6J-Mäusen Myozytenquerschnittsflächen von $149\mu\text{m}^2$ bei scheinoperierten Tiere und von $302\mu\text{m}^2$ 14 Tage nach LAD-Verschluss angegeben (keine Angaben zu Standardabweichung etc.). In der genannten Publikation von Yang et al. [106] wird die Zunahme der MCSA als ein bis zum vierten Monat nach dem Infarkt progredient verlaufender Prozess beschrieben. Bei adulten ICR-Mäusen wurden bei scheinoperierten Tieren durchschnittliche Myozytenquerschnittsflächen von $155 \pm 9 \mu\text{m}^2$ und 28 Tage nach einem Infarkt im *remote myocardium* von $230 \pm 32 \mu\text{m}^2$ [92].

Auch in den eigenen Versuchen sind die durchschnittlichen Myozytenquerschnittsflächen nach Myokardinfarkt signifikant größer als die der scheinoperierten Kontrolltiere. In den hier durchgeführten Versuchen liegt die durchschnittliche MCSA der scheinoperierten Tiere bei $151 \pm 4 \mu\text{m}^2$, die der mit BMP2 behandelten Versuchsgruppe bei $217 \pm 7 \mu\text{m}^2$ und die der PBS-Versuchsgruppe bei $188 \pm 8 \mu\text{m}^2$. Die mit BMP2 behandelten Tiere weisen somit größere Myozytenquerschnittsflächen auf als die der PBS-Behandlungsgruppe. Diese Beobachtung kann auf die größeren Infarkte und die daraus resultierenden oben beschriebenen Mechanismen des

Postinfarkt-Remodelings zurückgeführt werden. Desweiteren wurde allerdings in der Literatur auch die Eigenschaft von BMP2 beschrieben, die Bildung kontraktile Proteine in Kardiomyozyten zu induzieren [86]. Obwohl dieser Effekt in den eigenen Experimenten nicht ausgeschlossen werden kann, erscheint es jedoch aufgrund der Versuchsgestaltung (einmalig BMP2-Applikation vor Infarkt-Induktion) als wenig wahrscheinlich, dass dies als wesentlicher Mechanismus der beobachteten Effekte anzusehen ist.

Bezüglich der interstitiellen Fibrose als weiteren Teilaspekt des kardiale Remodelings beschreibt die Arbeitsgruppe um Fang Yang vier Wochen nach einem durch LAD-Ligatur induzierten Infarkt bei 10-12 Wochen alten, männlichen C57BL/6J-Mäusen eine interstitielle Kollagenfraktion (ICF) von ca. 11% im Vergleich zu einer ICF von 4,5% der schein-operierten Tiere (keine Angaben zu Standardabweichung etc.) [106, 120]. Weiterhin wurde beobachtet, dass die ICF bis zum vierten Monat nach dem Infarkt kontinuierlich zunimmt und dann bei ca.13% konstant bleibt [106]. Eine andere Arbeitsgruppe beschreibt bei 12 Wochen alten, männlichen C57BL/6J-Mäusen ähnliche Werte mit einer normalen ICF von 5,4% und 14 Tage nach einem Infarkt durch LAD-Ligatur von 10,4% (keine Angaben zu Standardabweichung etc.) [120]. Bei ICR-Mäusen werden in der Literatur bei gesunden Tieren ICF-Anteile von $5,5 \pm 0,6\%$ und 28 Tage nach einem Infarkt von $6,8 \pm 0,7\%$ beschrieben [92]. In den eigenen Versuchen werden 21 Tage nach dem Infarkt für die schein-operierten Tiere eine ICF von $5,2 \pm 0,3\%$ gemessen. Die infarktgeschädigten Herzen der mit BMP2 behandelten Tiere weisen eine ICF von $6,5 \pm 0,2\%$ und die der mit PBS behandelten Tiere von $6,1 \pm 0,2\%$ auf. Innerhalb der Infarktgruppen weisen die Tiere der BMP2-Behandlungsgruppe, bei denen wie beschrieben eine größere Ausdehnung der Myokardinfakte vorlag, eine größere interstitielle Kollagen-Fraktion auf. Da die Fibrosierung der infarktgeschädigten Herzen über einen Zeitraum von vier Monaten erfolgt [106], können ICF-Werte von 6,1% bis 6,5% 21 Tage nach einem Infarkt durchaus als in der Norm liegend betrachtet werden. In der Literatur wird beschrieben, dass BMP2 die Kollagensynthese induziert [84]. Es ist aber zu nicht davon auszugehen, dass eine einmalige präoperative BMP2 Applikation für die gesteigerte Kollagensynthese der mit BMP2 behandelten Tiere nach Myokardinfarkt im Sinne eines direkten pharmakologischen Effektes verantwortlich ist. Vielmehr ist anzunehmen, dass die Induktion der Kollagensynthese durch die oben beschriebenen Mechanismen im Rahmen des Postinfarkt-Remodelings erfolgt. Der Unterschied der Kollagenmenge zwischen den beiden Infarktgruppen ist durch die größeren Infarktgebiete der BMP2 Behandlungsgruppe erklärt [15, 17, 18, 115, 119].

Da das Ausmaß des kardialen Remodelings von der Größe der verlorenen kontraktile Wandfläche abhängig ist (s.o.), ist die vergrößerte MCSA und ICF in der BMP2-Versuchsgruppe zu der PBS Versuchsgruppe durch die signifikant größeren Infarktareale erklärt.

In Bezug auf andere Organsysteme zeigen sich keine lichtmikroskopisch erkennbaren Veränderungen durch eine einmalige BMP2-Applikation.

Nach einer Schädigung können Herzmuskelzellen auf verschiedenen Wegen verloren gehen. Gegenwärtig werden drei Arten des Zelltodes unterschieden: die Apoptose, die Onkose und die Autophagie. Bei der Apoptose, dem programmierten Zelltod, handelt es sich um einen energieverbrauchenden, irreversiblen Vorgang, welcher auch als suizidaler Zelltod bezeichnet wird (Übersicht in [28]). Morphologisch sind eine Zellschrumpfung, Kondensation des Chromatins und normal erscheinende Mitochondrien zu beobachten. Die zelluläre DNA wird in gleich große Fragmente von 185 bis 200 bp, dem sogenannten DNA-Laddering zerteilt. Die Zelle wird fragmentiert, und es bilden sich "*apoptotic bodies*" mit intakter Membran aus, die von Makrophagen phagozytiert werden. Die Apoptose betrifft meist Einzelzellen, daher fehlt die lokalisierte Entzündungsreaktion, welche regelhaft bei der Onkose zu beobachten ist [121, 122].

Mit Onkose wird nach Schaper et al. der akzidentielle Zelltod durch äußere Noxen, beispielsweise durch Ischämie bezeichnet [123]. Im Gegensatz zur Apoptose läuft die Onkose ohne eine Aktivierung der Caspasen-Kaskade ab und ist kein energie-verbrauchender Prozess [122, 123]. Morphologisch führt die initiale Zellschädigung zu Schäden im Bereich des Sarkolemms. Es kann ein Zellödem, eine Membranleckage und eine Destruktion der Mitochondrien bei zunächst intaktem Zellkern beobachtet werden. Durch den Austritt lysosomaler Enzyme und die Aktivierung des Komplementsystems kommt es zu einer Entzündungsreaktion. Die Onkose betrifft in der Regel Zellgruppen [121-123].

Der Begriff Nekrose wird von vielen anderen Autoren für die Beschreibung des akzidentiellen Zelltodes (nach Schaper: ‚Onkose‘) benutzt. Nach Auffassung von Schaper et al. beschreibt der Vorgang der Nekrose allerdings den abschliessenden Prozess des Zellabbaus nach jeder Art des Zelltodes (sowohl nach Apoptose als auch nach Onkose auftretend) [123].

Neben der Apoptose wurde eine weitere Art des programmierten Zelltodes entdeckt, die Autophagie, welche als programmierter Zelltod Typ II bezeichnet wird [122, 124, 125]. Der Begriff Autophagozytose stammt aus dem Griechischen und bedeutet „sich selbst essen“. Zunächst wurde die Autophagie als Mechanismus entdeckt, der dem Recycling von Zellbestandteilen dient. Es werden hierbei intrazytoplasmatische Bestandteile unterschiedlicher Größe von einer Doppelmembran umschlossen und ein sogenanntes Autophagosom gebildet. Dieses verschmilzt dann mit einem Lysosom, und der Inhalt wird in die einzelnen Bausteine degradiert. Anschließend werden die einzelnen Moleküle, z.B. Aminosäuren, von der Vakuole ins Cytosol zurücktransportiert und somit dem Stoffwechsel erneut zur Verfügung gestellt [124].

Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass unter gewissen Umständen Autophagie auch zu einem programmierten Zelltod führen kann. Der autophagische Tod wird vor allem beobachtet, wenn die Apoptose gehemmt wird, die Zellen nicht leicht von Makrophagen beseitigt werden können oder eine massive Zelldegeneration auftritt. Bei der Autophagie erfolgt die Zelldegradation über zelleigene Lysosomen [26, 122, 124].

In früheren Studien konnte für BMP2 eine antiapoptotische Wirkung durch die Induktion des Smad 1-Signalwegs bei neonatalen Rattenkardiomyozyten nach Serum-Entzug nachgewiesen werden [42, 43]. In diesem Modellsystem induziert BMP2 die Bildung des antiapoptotischen Faktors bcl-xL [42].

In Zellkulturversuchen wird im Rahmen der eigenen Arbeit untersucht, inwieweit BMP2 protektive Effekte unter oxidativem Stress auf adulte Rattenkardiomyozyten zeigt. Im Rahmen eines Myokardinfarktes sind während der Ischämie als auch nach einer Reperfusion die Myokardzellen einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt, was zu Zellschäden und -verlust führt. Um in Zellkulturen oxidativen Stress zu induzieren, hat sich der Einsatz von Wasserstoffperoxid, einem stabilen molekularen Oxidans, etabliert.

In den eigenen Versuchen wird nachgewiesen, dass der Zusatz von 200µM H₂O₂ den Anteil vitaler Kardiomyozyten in Primärkulturen adulter Rattenkardiomyozyten senkt und zur deutlichen Steigerung der Apotoserate führt. Die Zellschädigung mittels anhaltender Hypoxie (Inkubation der Zellen unter reduziertem Sauerstoffgehalt im Inkubator von 2% statt 21% für 48h) führt bei den Experimenten auch zu einer signifikanten Abnahme der vitalen Herzmuskelzellen, allerdings unterscheidet sich der prozentuale Anteil der apoptotischen Kardiomyozyten nicht von unbehandelten Kontrollkulturen. Dieses Ergebnis zeigt in Übereinstimmung mit zuvor publizierten Ergebnissen [123], dass die Mehrzahl der Zellen unter Hypoxie nicht durch Apoptose verloren geht sondern dass die Hypoxie primär zu einem Zelltod durch Onkose führt.

In den eigenen Experimenten führt der Zusatz von BMP2 zu Zellkulturen, in denen durch H₂O₂ oxidativer Stress induziert wurde, zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der vitalen Zellen. In den Kontrollkulturen, denen 200µM H₂O₂ zugesetzt wurde, konnten 27 ± 13 vitale Zellen pro mikroskopischem Gesichtsfeld gesehen werden. Der Zusatz von 40ng/ml BMP2 bewirkte eine Zunahme auf 43 ± 17 Zellen, der Zusatz von 80ng/ml BMP2 einen signifikanten Anstieg auf 72 ± 27 Zellen und der Zusatz von 160ng/ml BMP2 auf 49 ± 20 vitale Myozyten pro Gesichtsfeld. Gleichzeitig kann nachgewiesen werden, dass der Anteil an apoptotischen Kardiomyozyten mit steigender BMP2-Konzentration abnimmt. Bei dem Zusatz von 80ng/ml BMP2 konnte eine signifikante Reduktion der apoptotischen Zellen um im Mittel 31% detektiert werden. Auch 40 und 160ng BMP2 führten zu einer signifikanten Abnahme der apoptotischen Zellen. Hiermit wird demnach belegt, dass BMP2 isolierte adulte Rattenkardiomyozyten vor der durch oxidativen Stress induzierten Apoptose zu schützen vermag.

Bei den Zellkulturversuchen, in denen die Kardiomyozyten unter anhaltender Hypoxie kultiviert werden, findet sich unter Zugabe von BMP2 ebenfalls ein signifikanter Anstieg der vitalen Zellen. In den Kontrollkulturen konnten bei Inkubation unter Hypoxie 138 ± 38 vitale Kardiomyozyten pro Gesichtsfeld gezählt werden. Der Zusatz von 80ng BMP2 bewirkte eine signifikante Zunahme der vitalen Zellen pro Gesichtsfeld auf 197 ± 42. Allerdings hat BMP2 hier keinen Einfluss auf die Apoptose-Häufigkeit. Dies ist insofern nicht verwunderlich, da in diesem Modellsystem wie oben

beschrieben nicht Apoptose, sondern Onkose („Nekrose“) als entscheidender Mechanismus der Zelluntergänge anzusehen ist.

Es ist ein erstaunlicher Befund, dass BMP2 sowohl den durch H₂O₂ induzierten apoptotischen als auch den durch Hypoxie ausgelösten onkotischen Zelltod zu verhindern vermag. In der Literatur wurde zuvor beschrieben, dass eine gezielte Expression von Bcl-xL in einem Modell der Kryokonservierung von Rattenherzen sowohl zu kleineren Infarktzone (Nekrosezone) führt, als auch einen apoptotischen Zelltod der Myozyten verhindert [126]. Diese Beobachtung ist daher höchst interessant, da andere Studien belegen, dass BMP2 zu einer Aktivierung von Bcl-xL führt [42, 101]. Vor dem Hintergrund dieser Datenlage kann die Hypothese aufgestellt werden, dass BMP2/ Bcl-xL einer Signalkaskade angehören, welche sowohl mit dem Ischämie-induzierten nicht-apoptotischen Zelltod, als auch der Apoptose in Kardiomyozyten interagiert.

Zusammenfassend ergibt sich, dass BMP2 das Überleben von Kardiomyozyten sowohl unter oxidativem Stress als auch unter Hypoxie nachhaltig verbessert.

Der größte protektive Effekt konnte in den Zellkulturexperimenten bei einer Konzentration von jeweils 80ng/ml BMP2 beobachtet werden. Ob die protektiven Wirkungen des BMP2 auch hier über den Smad 1 Signalweg und die Induktion des antiapoptotischen bcl-2-Familienmitgliedes Bcl-xL erfolgt, ist im Rahmen der eigenen Arbeit nicht untersucht worden. In weiterführenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte jedoch gezeigt werden, dass die Applikation von BMP2 in Kulturen adulter Kardiomyozyten die Phosphorylierung von Smad 1/5/8 bewirkt. In diesen Experimenten wurden supraphysiologische BMP2-Dosierungen eingesetzt, um eine mögliche Koaktivierung des TGFβ-Signalweges sichtbar zu machen. Es zeigte sich aber, dass BMP2 auch in diesen hohen Konzentrationen den TGFβ-Signalweg nicht aktiviert und somit unerwünschte, durch den TGFβ-Signalweg vermittelte Wirkungen nicht induziert werden [127, 128]. Desweiteren zeigte sich in ergänzenden Zellkulturexperimenten, dass es unter Bedingungen der vollständigen Anoxie zu einer vermehrten Entleerung der ATP-Speicher sowie zur Spaltung von Caspase 3 kommt – der Zusatz von BMP2 verminderte sowohl den ATP-Verbrauch als auch die Caspase 3 Aktivierung [127, 128].

In weiterführenden Experimenten der eigenen Arbeitsgruppe wurde die Anzahl apoptotischer Zellen in Mausmodell mit chronischem LAD-Verschluss untersucht. Nach präoperativer BMP2-Applikation fand sich hierbei im Vergleich zu einer mit PBS behandelten Kontrollgruppe eine signifikant reduzierte Anzahl apoptotischer Zellen sowohl in der Randzone des Myokardinfarktes als auch im *remote myocardium* [127, 128]. Die geschilderten Ergebnisse untermauern in ihrer Summe somit weiter den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befund der antiapoptotischen und zytoprotektiven Wirkung von BMP2.

In einer weiteren Versuchsreihe im Rahmen der eigenen Arbeit wird die Wirkung von BMP2 auf das Kontraktionsverhalten kultivierter neonataler Rattenkardiomyozyten analysiert. Die Untersuchungen

an isolierten Herzmuskelzellen erlauben eine Detailanalyse der maximalen Zellkontraktion und der Verkürzungsdynamik.

In der Versuchsreihe mit spontan kontrahierenden neonatalen Rattenkardiomyozyten zeigt sich unter BMP2-Gabe im Trend eine Steigerung der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit der Einzelkontraktionen als Hinweis auf einen positiv-inotropen Effekt. Ausserdem findet sich bei Zusatz von 80ng/ml BMP2 eine signifikante Steigerung der Kontraktionsfrequenz. In Untersuchungen, bei denen die Kardiomyozyten mit einer festgelegten Frequenz von 120 pro Minute elektrisch stimuliert werden (2Hz), zeigt sich eine signifikante Steigerung der Kontraktionsgeschwindigkeit (= positiv inotroper Effekt) unter dem Einfluss von BMP2 im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe. Auch die Relaxationsgeschwindigkeit (= Lusitropie) der Zellen wird durch BMP2 bei dieser Versuchsanordnung signifikant gesteigert.

Um eine Änderung der Herzfrequenz und Kontraktilität *in vivo* zu erreichen, werden durch das adrenerge System Signalkaskaden in Gang gesetzt, welche die intrazellulären Kalzium- und cAMP-Spiegel verändern (Übersicht in [129]). Der erhöhte Gehalt an cAMP aktiviert die Proteinkinase A, welche ihrerseits unter anderem Troponin I, den L-Typ-Kalziumkanal und Phospholambdan aktiviert [130]. Darüber hinaus wird in den Herzen von Säugetieren über G-Proteine auch die Phosphoinositol-3-Kinase (PI-3-Kinase) aktiviert. Verschieden Studien haben ergeben, dass die PI-3-Kinase Einfluss auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten nimmt [130] und dass der Adenosinmonophosphatspiegel im Sarkoplasmatischen Retikulum auch über die PI3-Kinase reguliert wird [131].

In der Literatur wurde beschrieben, dass BMP2 über die Induktion der Phosphoinositol-3-Kinase die Kontraktionsgeschwindigkeit adulter Rattenkardiomyozyten erhöht [56]. Es ist derzeit noch nicht bekannt, ob die oben genannten positiv-inotropen und –chronotropen Effekte von BMP2 durch eine Modulation des cAMP-Spiegels über die PI-3-Kinase erfolgt, wie dies aufgrund der geschilderten Zusammenhänge vorstellbar wäre.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass eine Applikation des *Bone morphogenetic protein 2* das Überleben der Versuchstiere nach einem akuten Myokardinfarkt im Mausmodell verbessert. Insbesondere Tiere mit sehr großen Myokardinfarkten, die in der Kontrollgruppe bereits früh nach der Infarktinduktion versterben, überleben nach Gabe von BMP2. Anhalt für unerwünschte Wirkungen, wie fibrotische Veränderungen an anderen Organsystemen, finden sich nach der einmaligen Verabreichung von BMP2 hierbei nicht. Zellkulturexperimente belegen, dass die Gabe von BMP2 antiapoptotische Effekte unter Bedingungen von erhöhtem oxidativen Stress entfaltet und die Hypoxie-Resistenz von Kardiomyozyten verbessert. Die Gabe von BMP2 führt außerdem zu kontraktilitätssteigernden Effekten an isolierten Herzmuskelzellen. Die Gabe von BMP2 könnte daher einen Therapieansatz zur Myokardprotektion darstellen.

6. Schlussfolgerungen

Im murinen Herzinfarktmodell der Maus verbessert BMP2 das Überleben der Versuchstiere nach einem akuten Myokardinfarkt.

BMP2 führt bei adulten Kardiomyozyten unter Stressbedingungen in der Zellkultur zu protektiven Effekten. Die Vitalität von adulten Kardiomyozyten wird unter Hypoxie bzw. in Gegenwart von H₂O₂ durch BMP2 signifikant gesteigert.

BMP2 führt bei neonatalen Kardiomyozyten zur signifikanten Steigerung der spontanen Kontraktionsfrequenz und der Inotropie von elektrisch stimulierten Kontraktionen.

Die Gabe von BMP2 könnte daher möglicherweise einen vielversprechenden Therapieansatz zur Myokardprotektion darstellen.

7. Zusammenfassung

Diese Arbeit untersucht, inwiefern die Gabe von BMP2 bei Kardiomyozyten unter Stressbedingungen zu protektiven Effekten führt. Um diese Fragestellung zu klären, werden in einem *in-vivo*-Myokardinfarktmodell bei adulten ICR-Mäusen durch Ligatur der linken Koronararterie Myokardinfarkte induziert, nachdem die Tiere 30 Minuten zuvor eine Injektion von BMP2 beziehungsweise PBS (= Kontrollgruppe) erhalten hatten. Das Überleben der Tiere wird protokolliert, und 21 Tage nach dem Verschluss der LAD werden die Herzen auf die Infarktgröße, die Myozytenquerschnittsflächen und die interstitielle Kollagenfraktion als Parameter des *adverse remodelings* untersucht. Teile der Lunge, der Leber und des Zwerchfells werden lichtmikroskopisch auf pathologisch erscheinende Veränderungen, wie ektopische Knochenbildung oder vermehrte Fibrosierung, untersucht. Echokardiographisch werden präoperativ und nach dem Infarkt morphologische und funktionelle Parameter der Herzen *in vivo* bestimmt. Weiterhin wird in Zellkulturexperimenten untersucht, welchen Effekt die Gabe von BMP2 auf die Vitalität und Apoptoserate von adulten Kardiomyozyten unter Hypoxie bzw. in Gegenwart von H₂O₂ hat. Es wird analysiert, ob BMP2 die Schlagfrequenz und Kontraktilität von isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten beeinflusst.

Die Untersuchungen ergeben, dass die Applikation von BMP2 im murinen Herzinfarktmodell der Maus das Überleben der Versuchstiere in den ersten 24 Stunden nach einem Myokardinfarkt verbessert. In der Kontrollgruppe zeigen die Tiere mit sehr großen Infarkten in den ersten Stunden nach dem Infarkt eine sehr hohe Letalität. Die Gabe von BMP2 führt in dieser Zeit zu einer Reduktion der Sterblichkeit. Auf histologischer Ebene schlägt sich dies in dem zunächst paradox erscheinenden Effekt nieder, dass die mittlere Infarktausdehnung der überlebenden Tiere in der BMP2-Gruppe 21 Tage nach dem LAD-Verschluss signifikant größer ist als bei den Kontrolltieren. Dies kann jedoch dadurch erklärt werden, dass nach BMP2-Behandlung auch Tiere mit sehr großen Infarkten überleben, die in der PBS-Vergleichsgruppe bereits früh versterben und daher nicht in die Analysen eingehen. Die Zellkulturuntersuchungen ergeben, dass BMP2 bei adulten Kardiomyozyten unter Stressbedingungen protektive Effekte zeigt. Die Vitalität von adulten Kardiomyozyten wird sowohl unter Hypoxie als auch in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) durch BMP2 signifikant gesteigert, und BMP2 reduziert die H₂O₂-induzierte Apoptose von isolierten adulten Kardiomyozyten. BMP2 führt bei neonatalen Kardiomyozyten zur Steigerung der spontanen Kontraktionsfrequenz und der Inotropie von elektrisch stimulierten Kontraktionen. Die Gabe von BMP2 könnte daher möglicherweise einen Therapieansatz zur Myokardprotektion darstellen.

8. Literaturverzeichnis

1. Hamm C (2004) Leitlinien: Akutes Koronarsyndrom (ACS). Teil 1: ACS ohne persistierende ST-Hebung. *Z Kardiologie* 93(1): 72-90.
2. Donner-Banzhoff N, Held K, Laufs U, Trappe H J, Werdan K, Zerkowski H R (2008) Nationale VersorgungsLeitlinie chronische KHK. Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin Bundesärztekammer, Arbeitsgemeinschaft der Deutschen Ärztekammer. S.19-199
3. Moss A J, Ryan D, Oakes D, Goldstein R E, Greenberg H, Bodenheimer M M, Brown M W, Case R B, Dwyer E M Jr, Eberly S W, Francis C W, Gillespie J A, Krone R J, Lichstein E, Maccluer J W, Marcus F I, Mccarthy J, Sparks C E, Zareba W (2005) Atherosclerotic risk genotypes and recurrent coronary events after myocardial infarction. *Am J Cardiol* 96(2): 177-82.
4. Schunkert H, Doring A, Kuch B, Holmer S, Luchner A, Muscholl M, Fischer M, Hengstenberg C, Riegger G A, Hense H W (2005) Cardiovascular phenotypes and functional parameters in the general population--results of the MONICA/KORA studies. *Gesundheitswesen* 67 Suppl 1: 74-8.
5. Tanner F (1999) Gentherapie bei Herzerkrankungen. *Schweiz Med Wochenschr* 129(46): 1784-1789.
6. A. Roessner: Grundlagen zur Pathologie des Kreislaufes. In: A. Roessner, U. Pfeiffer, H.K. Müller-Hermelink (Hrsg.), *Allgemeine Pathologie*. Grundmann, Urban & Fischer, München, Jena, 2004, S.259.
7. W. Terres, J. Kähler, D. Koschyk: Akuter Myokardinfarkt. In: A. & K. Bob, *Duale Reihe: Innere Medizin*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2001, S.143.
8. Mehta S R (2003) Aspirin and clopidogrel in patients with ACS undergoing PCI: CURE and PCI-CURE. *J Invasive Cardiol* 15 Suppl B: 17B-20B; discussion 20B-21B.
9. Bhatt D L (2006) Can clopidogrel and aspirin lower mortality in patients with acute myocardial infarction? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3(4): 182-3.
10. Van De Werf F, Bax J, Betriu A, Blomstrom-Lundqvist C, Crea F, Falk V, Filippatos G, Fox K, Huber K, Kastrati A, Rosengren A, Steg P G, Tubaro M, Verheugt F, Weidinger F, Weis M, Vahanian A, Camm J, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Funck-Brentano C, Hellems I, Kristensen S D, Mcgregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano J L, Aguirre F V, Al-Attar N, Alegria E, Andreotti F, Benzer W, Breithardt O, Danchin N, Di Mario C, Dudek D, Gulba D, Halvorsen S, Kaufmann P, Kornowski R, Lip G Y, Rutten F (2008) Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 29(23): 2909-45.
11. Hamm C W (2009) Kommentar zu den Leitlinien der European Society of Cardiology (ESC) zur Diagnose und Therapie des akuten Koronarsyndroms ohne ST-Strecken-Hebung (NSTEMI-ACS). *Der Kardiologe* 3 (2): 81-100
12. Dietz R and Rauch B (2003) [Guidelines for diagnosis and treatment of chronic coronary heart disease. Issued by the executive committee of the German Society of Cardiology--Heart Circulation Research in cooperation with the German Society for Prevention and Rehabilitation of Cardiac Diseases and the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery]. *Z Kardiologie* 92(6): 501-21.
13. Swynghedauw B (2006) Phenotypic plasticity of adult myocardium: molecular mechanisms. *J Exp Biol* 209(Pt 12): 2320-7.
14. Gaudron P, Eilles C, Kugler I, Ertl G (1993) Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors. *Circulation* 87(3): 755-63.
15. Auer J, Berent R, Eber B (2001) [Pathophysiology and therapeutic aspects of left ventricular "remodeling" in the post-infarct phase]. *Acta Med Austriaca* 28(5): 117-22.
16. Weisman H F, Bush D E, Mannisi J A, Weisfeldt M L, Healy B (1988) Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion. *Circulation* 78(1): 186-201.

17. Zimmerman S D, Karlson W J, Holmes J W, Omens J H, Covell J W (2000) Structural and mechanical factors influencing infarct scar collagen organization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**(1): H194-200.
18. Pfeffer M A and Braunwald E (1990) Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* **81**(4): 1161-72.
19. J. Schrader: Das Herz. In: R. Klinke, S. Silbernagl (Hrsg.), *Lehrbuch der Physiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart; New York, 2001, S.124
20. Tonnessen T and Knudsen C W (2005) Surgical left ventricular remodeling in heart failure. *Eur J Heart Fail* **7**(5): 704-9.
21. Colucci W S (1997) Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure. *Am J Cardiol* **80**(11A): 15L-25L.
22. Willenheimer R (2000) Left ventricular remodeling and dysfunction. Can the process be prevented? *Int J Cardiol* **72**(2): 143-50.
23. Weber K T and Brilla C G (1991) Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* **83**(6): 1849-65.
24. Weber K T and Brilla C G (1992) Factors associated with reactive and reparative fibrosis of the myocardium. *Basic Res Cardiol* **87** **Suppl 1**: 291-301.
25. Kitsis R N and Mann D L (2005) Apoptosis and the heart: a decade of progress. *J Mol Cell Cardiol* **38**(1): 1-2.
26. Takemura G and Fujiwara H (2004) Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction. *Pharmacol Ther* **104**(1): 1-16.
27. Van Empel V P, Bertrand A T, Hofstra L, Crijns H J, Doevendans P A, De Windt L J (2005) Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovasc Res* **67**(1): 21-9.
28. Saraste A (1999) Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz* **24**(3): 189-95.
29. Watanabe T, Otsu K, Takeda T, Yamaguchi O, Hikoso S, Kashiwase K, Higuchi Y, Taniike M, Nakai A, Matsumura Y, Nishida K, Ichijo H, Horii M (2005) Apoptosis signal-regulating kinase 1 is involved not only in apoptosis but also in non-apoptotic cardiomyocyte death. *Biochem Biophys Res Commun* **333**(2): 562-7.
30. Fuentes-Prior P and Salvesen G S (2004) The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* **384**(Pt 2): 201-32.
31. W. Böcker: Formen des Zelltodes. In: W. Böcker, H.D., Ph. U. Heitz (Hrsg.) *Pathologie*, Urban & Fischer, Elsevier GmbH. München, 2004, S. 66.
32. Wang J and Lenardo M J (2000) Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *J Cell Sci* **113** (Pt 5): 753-7.
33. Hitami J, Katayama T, Honda P (2004) Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase 3 via caspase 12. *Neurosci Lett* **357**: 127-130.
34. Yamaguchi S, Yamaoka M, Okuyama M, Nitoube J, Fukui A, Shirakabe M, Shirakawa K, Nakamura N, Tomoike H (1999) Elevated circulating levels and cardiac secretion of soluble Fas ligand in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* **83**(10): 1500-3, A8.
35. Hayakawa Y, Chandra M, Miao W, Shirani J, Brown J H, Dorn G W 2nd, Armstrong R C, Kitsis R N (2003) Inhibition of cardiac myocyte apoptosis improves cardiac function and abolishes mortality in the peripartum cardiomyopathy of Galpha(q) transgenic mice. *Circulation* **108**(24): 3036-41.
36. Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor S M, Shirani J, Armstrong R C, Kitsis R N (2003) A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest* **111**(10): 1497-504.
37. Engel D, Peshock R, Armstrong R C, Sivasubramanian N, Mann D L (2004) Cardiac myocyte apoptosis provokes adverse cardiac remodeling in transgenic mice with targeted TNF overexpression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**(3): H1303-11.
38. Lee P, Sata M, Lefer D J, Factor S M, Walsh K, Kitsis R N (2003) Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**(2): H456-63.
39. Li Q, Li B, Wang X, Leri A, Jana K P, Liu Y, Kajstura J, Baserga R, Anversa P (1997) Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after

- infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* **100**(8): 1991-9.
40. Buerke M, Murohara T, Skurk C, Nuss C, Tomaselli K, Lefer A M (1995) Cardioprotective effect of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(17): 8031-5.
 41. Schneiders D, Heger J, Best P, Piper M H, Taimor G (2005) SMAD proteins are involved in apoptosis induction in ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* **67**(1): 87-96.
 42. Izumi M, Fujio Y, Kunisada K, Negoro S, Tone E, Funamoto M, Osugi T, Oshima Y, Nakaoka Y, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K, Hirota H (2001) Bone morphogenetic protein-2 inhibits serum deprivation-induced apoptosis of neonatal cardiac myocytes through activation of the Smad1 pathway. *J Biol Chem* **276**(33): 31133-41.
 43. Euler-Taimor G and Heger J (2006) The complex pattern of SMAD signaling in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* **69**(1): 15-25.
 44. Shimasaki S, Moore R K, Otsuka F, Erickson G F (2004) The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev* **25**(1): 72-101.
 45. Zhang H and Bradley A (1996) Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* **122**(10): 2977-86.
 46. Chen D, Zhao M, Mundy G R (2004) Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* **22**(4): 233-41.
 47. Kawabata M, Imamura T, Miyazono K (1998) Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* **9**(1): 49-61.
 48. Rosenzweig B L, Imamura T, Okadome T, Cox G N, Yamashita H, Ten Dijke P, Heldin C H, Miyazono K (1995) Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(17): 7632-6.
 49. Urist M R (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science* **150**(698): 893-9.
 50. Behnam K, Phillips M L, Silva J D, Brochmann E J, Duarte M E, Murray S S (2005) BMP binding peptide: a BMP-2 enhancing factor deduced from the sequence of native bovine bone morphogenetic protein/non-collagenous protein. *J Orthop Res* **23**(1): 175-80.
 51. Luyten F P, Cunningham N S, Ma S, Muthukumaran N, Hammonds R G, Nevins W B, Woods W I, Reddi A H (1989) Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J Biol Chem* **264**(23): 13377-80.
 52. Osyczka A M and Leboy P S (2005) Bone morphogenetic protein regulation of early osteoblast genes in human marrow stromal cells is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Endocrinology* **146**(8): 3428-37.
 53. Smith E, Yang J, Mcgann L, Sebald W, Uludag H (2005) RGD-grafted thermoreversible polymers to facilitate attachment of BMP-2 responsive C2C12 cells. *Biomaterials* **26**(35): 7329-38.
 54. Nishimura R, Kato Y, Chen D, Harris S E, Mundy G R, Yoneda T (1998) Smad5 and DPC4 are key molecules in mediating BMP-2-induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *J Biol Chem* **273**(4): 1872-9.
 55. Hogan B L (1996) Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* **10**(13): 1580-94.
 56. Ghosh-Choudhury N, Abboud S L, Chandrasekar B, Ghosh Choudhury G (2003) BMP-2 regulates cardiomyocyte contractility in a phosphatidylinositol 3 kinase-dependent manner. *FEBS Lett* **544**(1-3): 181-4.
 57. Hogan B L, Blessing M, Winnier G E, Suzuki N, Jones C M (1994) Growth factors in development: the role of TGF-beta related polypeptide signalling molecules in embryogenesis. *Dev Suppl*: 53-60.
 58. Guo X and Wang X F (2009) Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res* **19**(1): 71-88.
 59. Macias-Silva M, Hoodless P A, Tang S J, Buchwald M, Wrana J L (1998) Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *J Biol Chem* **273**(40): 25628-36.

60. Liu F, Ventura F, Doody J, Massague J (1995) Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol* **15**(7): 3479-86.
61. Huse M, Chen Y G, Massague J, Kuriyan J (1999) Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12. *Cell* **96**(3): 425-36.
62. Heldin C H, Miyazono, K., Ten Dijke, P. (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**(6659): 465-71.
63. Koenig B B, Cook J S, Wolsing D H, Ting J, Tiesman J P, Correa P E, Olson C A, Pecquet A L, Ventura F, Grant R A (1994) Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* **14**(9): 5961-74.
64. Massague J and Chen Y G (2000) Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* **14**(6): 627-44.
65. Hoodless P A, Haerry T, Abdollah S, Stapleton M, O'connor M B, Attisano L, Wrana J L (1996) MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell* **85**(4): 489-500.
66. Chen Y, Bhushan A, Vale W (1997) Smad8 mediates the signaling of the ALK-2 [corrected] receptor serine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(24): 12938-43.
67. Massague J and Wotton D (2000) Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo J* **19**(8): 1745-54.
68. Song L, Yan W, Chen X, Deng C X, Wang Q, Jiao K (2007) Myocardial smad4 is essential for cardiogenesis in mouse embryos. *Circ Res* **101**(3): 277-85.
69. Zhang Y, Feng X H, Derynck R (1998) Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature* **394**(6696): 909-13.
70. Hua X, Miller Z A, Wu G, Shi Y, Lodish H F (1999) Specificity in transforming growth factor beta-induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene: interactions of promoter DNA, transcription factor muE3, and Smad proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(23): 13130-5.
71. Pardali E, Xie X Q, Tsapogas P, Itoh S, Arvanitidis K, Heldin C H, Ten Dijke P, Grundstrom T, Sideras P (2000) Smad and AML proteins synergistically confer transforming growth factor beta1 responsiveness to human germ-line IgA genes. *J Biol Chem* **275**(5): 3552-60.
72. Shi Y, Wang Y F, Jayaraman L, Yang H, Massague J, Pavletich N P (1998) Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* **94**(5): 585-94.
73. Onichtchouk D, Chen Y G, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massague J, Niehrs C (1999) Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* **401**(6752): 480-5.
74. Chen X, Weisberg E, Fridmacher V, Watanabe M, Naco G, Whitman M (1997) Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature* **389**(6646): 85-9.
75. Murakami G, Watabe T, Takaoka K, Miyazono K, Imamura T (2003) Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol Biol Cell* **14**(7): 2809-17.
76. Van Grunsven L A, Michiels C, Van De Putte T, Nelles L, Wuytens G, Verschuere K, Huylebroeck D (2003) Interaction between Smad-interacting protein-1 and the corepressor C-terminal binding protein is dispensable for transcriptional repression of E-cadherin. *J Biol Chem* **278**(28): 26135-45.
77. Yoshida Y, Tanaka S, Umemori H, Minowa O, Usui M, Ikematsu N, Hosoda E, Imamura T, Kuno J, Yamashita T, Miyazono K, Noda M, Noda T, Yamamoto T (2000) Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts. *Cell* **103**(7): 1085-97.
78. Padgett R W, Wozney J M, Gelbart W M (1993) Human BMP sequences can confer normal dorsal-ventral patterning in the Drosophila embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(7): 2905-9.
79. Sampath T K, Rashka K E, Doctor J S, Tucker R F, Hoffmann F M (1993) Drosophila transforming growth factor beta superfamily proteins induce endochondral bone formation in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(13): 6004-8.

80. Goldman D C, Donley N, Christian J L (2008) Genetic interaction between Bmp2 and Bmp4 reveals shared functions during multiple aspects of mouse organogenesis. *Mech Dev.*
81. Ghosh-Choudhury N, Abboud S L, Mahimainathan L, Chandrasekar B, Choudhury G G (2003) Phosphatidylinositol 3-kinase regulates bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)-induced myocyte enhancer factor 2A-dependent transcription of BMP-2 gene in cardiomyocyte precursor cells. *J Biol Chem* **278**(24): 21998-2005.
82. Monsoro-Burq A H, Duprez D, Watanabe Y, Bontoux M, Vincent C, Brickell P, Le Douarin N (1996) The role of bone morphogenetic proteins in vertebral development. *Development* **122**(11): 3607-16.
83. Abdelwahid E, Rice D, Pelliniemi L J, Jokinen E (2001) Overlapping and differential localization of Bmp-2, Bmp-4, Msx-2 and apoptosis in the endocardial cushion and adjacent tissues of the developing mouse heart. *Cell Tissue Res* **305**(1): 67-78.
84. Iwasaki S, Iguchi M, Watanabe K, Hoshino R, Tsujimoto M, Kohno M (1999) Specific activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway and induction of neurite outgrowth in PC12 cells by bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* **274**(37): 26503-10.
85. Kawai T, Takahashi T, Esaki M, Ushikoshi H, Nagano S, Fujiwara H, Kosai K (2004) Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. *Circ J* **68**(7): 691-702.
86. Behfar A, Zingman L V, Hodgson D M, Rauzier J M, Kane G C, Terzic A, Puceat M (2002) Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *Faseb J* **16**(12): 1558-66.
87. Hahn J Y, Cho H J, Kang H J, Kim T S, Kim M H, Chung J H, Bae J W, Oh B H, Park Y B, Kim H S (2008) Pre-treatment of mesenchymal stem cells with a combination of growth factors enhances gap junction formation, cytoprotective effect on cardiomyocytes, and therapeutic efficacy for myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **51**(9): 933-43.
88. Friedel R, Grubert S, Hofmann G (2006) Notwendigkeit von "bone morphogenetic proteins" in der Frakturbehandlung. *Trauma und Berufskrankheit* **8**(1): 45-48.
89. Hillger F, Herr G, Rudolph R, Schwarz E (2005) Biophysical comparison of BMP-2, ProBMP-2, and the free pro-peptide reveals stabilization of the pro-peptide by the mature growth factor. *J Biol Chem* **280**(15): 14974-80.
90. Korte T, Fuchs M, Guener Z, v Bonin J, De Sousa M, Niehaus M, Tebbenjohanns J, Drexler H (2002) In-vivo electrophysiological study in mice with chronic anterior myocardial infarction. *J Interv Card Electrophysiol* **6**(2): 121-32.
91. Lutgens E, Daemen M J, De Muinck E D, Debets J, Leenders P, Smits J F (1999) Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes. *Cardiovasc Res* **41**(3): 586-93.
92. Ebel H, Jungblut M, Zhang Y, Kubin T, Kostin S, Technau A, Oustanina S, Niebrugge S, Lehmann J, Werdan K, Braun T (2007) Cellular cardiomyoplasty: improvement of left ventricular function correlates with the release of cardioactive cytokines. *Stem Cells* **25**(1): 236-44.
93. Liu Y H, Yang X P, Sharov V G, Nass O, Sabbah H N, Peterson E, Carretero O A (1997) Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists in rats with heart failure. Role of kinins and angiotensin II type 2 receptors. *J Clin Invest* **99**(8): 1926-35.
94. Leineweber K, Seyfarth T, Abraham G, Gerbershagen H P, Heinroth-Hoffmann I, Ponicke K, Brodde O E (2003) Cardiac beta-adrenoceptor changes in monocrotaline-treated rats: differences between membrane preparations from whole ventricles and isolated ventricular cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* **41**(3): 333-42.
95. Werdan K and Erdmann E (1989) Preparation and culture of embryonic and neonatal heart muscle cells: modification of transport activity. *Methods Enzymol* **173**: 634-62.
96. Schmidt H, Saworski J, Werdan K, Muller-Werdan U (2007) Decreased beating rate variability of spontaneously contracting cardiomyocytes after co-incubation with endotoxin. *J Endotoxin Res* **13**(6): 339-42.
97. Lehnich H (2001) Digitalisierung, Verarbeitung und Auswertung von Videoaufzeichnungen in Echtzeit zur Kontraktilitätsmessung an isolierten Herzzellen, in *Praxiswissen Elektronik-*

- Industrie: Meßtechnik. Virtuelle Instrumente in der Praxis: Begleitband zum Kongress VIP 2001: 312-317.
98. Murray C J and Lopez A D (1997) Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* **349**(9064): 1498-504.
 99. Bassand J P, Hamm C W, Ardissino D, Boersma E, Budaj A, Fernandez-Aviles F, Fox K A, Hasdai D, Ohman E M, Wallentin L, Wijns W (2007) Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Eur Heart J* **28**(13): 1598-660.
 100. Baigent C, Collins R, Appleby P, Parish S, Sleight P, Peto R (1998) ISIS-2: 10 year survival among patients with suspected acute myocardial infarction in randomised comparison of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither. The ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. *Bmj* **316**(7141): 1337-43.
 101. Masaki M, Izumi M, Oshima Y, Nakaoka Y, Kuroda T, Kimura R, Sugiyama S, Terai K, Kitakaze M, Yamauchi-Takahara K, Kawase I, Hirota H (2005) Smad1 protects cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury. *Circulation* **111**(21): 2752-9.
 102. Katagiri T, Yamaguchi A, Ikeda T, Yoshiki S, Wozney J M, Rosen V, Wang E A, Tanaka H, Omura S, Suda T (1990) The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem Biophys Res Commun* **172**(1): 295-9.
 103. Collins K A, Korcarz C E, Shroff S G, Bednarz J E, Fentzke R C, Lin H, Leiden J M, Lang R M (2001) Accuracy of echocardiographic estimates of left ventricular mass in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**(5): H1954-62.
 104. Condorelli G, Drusco A, Stassi G, Bellacosa A, Roncarati R, Iaccarino G, Russo M A, Gu Y, Dalton N, Chung C, Latronico M V, Napoli C, Sadoshima J, Croce C M, Ross J Jr (2002) Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(19): 12333-8.
 105. Li Q, Guo Y, Tan W, Stein A B, Dawn B, Wu W J, Zhu X, Lu X, Xu X, Siddiqui T, Tiwari S, Bolli R (2006) Gene therapy with iNOS provides long-term protection against myocardial infarction without adverse functional consequences. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**(2): H584-9.
 106. Yang F, Liu Y H, Yang X P, Xu J, Kapke A, Carretero O A (2002) Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice. *Exp Physiol* **87**(5): 547-55.
 107. Yang X P, Liu Y H, Rhaleb N E, Kurihara N, Kim H E, Carretero O A (1999) Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice. *Am J Physiol* **277**(5 Pt 2): H1967-74.
 108. Tsutsui H, Ide T, Hayashidani S, Suematsu N, Shiomi T, Wen J, Nakamura K, Ichikawa K, Utsumi H, Takeshita A (2001) Enhanced generation of reactive oxygen species in the limb skeletal muscles from a murine infarct model of heart failure. *Circulation* **104**(2): 134-6.
 109. Tsoporis J N, Marks A, Haddad A, Dawood F, Liu P P, Parker T G (2005) S100B expression modulates left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation* **111**(5): 598-606.
 110. Bayat H, Swaney J S, Ander A N, Dalton N, Kennedy B P, Hammond H K, Roth D M (2002) Progressive heart failure after myocardial infarction in mice. *Basic Res Cardiol* **97**(3): 206-13.
 111. Pfeffer M A, Pfeffer J M, Fishbein M C, Fletcher P J, Spadaro J, Kloner R A, Braunwald E (1979) Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* **44**(4): 503-12.
 112. Michael L H, Entman M L, Hartley C J, Youker K A, Zhu J, Hall S R, Hawkins H K, Berens K, Ballantyne C M (1995) Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol* **269**(6 Pt 2): H2147-54.
 113. Degabriele N M, Griesenbach U, Sato K, Post M J, Zhu J, Williams J, Jeffery P K, Geddes D M, Alton E W (2004) Critical appraisal of the mouse model of myocardial infarction. *Exp Physiol* **89**(4): 497-505.
 114. Chareonthaitawee P, Christian T F, Hirose K, Gibbons R J, Rumberger J A (1995) Relation of initial infarct size to extent of left ventricular remodeling in the year after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **25**(3): 567-73.

115. Swynghedauw B (1999) Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* **79**(1): 215-62.
116. Hutchins G M and Bulkley B H (1978) Infarct expansion versus extension: two different complications of acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* **41**(7): 1127-32.
117. Liu F, Levin M D, Petrenko N B, Lu M M, Wang T, Yuan L J, Stout A L, Epstein J A, Patel V V (2008) Histone-deacetylase inhibition reverses atrial arrhythmia inducibility and fibrosis in cardiac hypertrophy independent of angiotensin. *J Mol Cell Cardiol* **45**(6): 715-23.
118. Weber K T (1997) Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation* **96**(11): 4065-82.
119. St John Sutton M, Lee D, Rouleau J L, Goldman S, Plappert T, Braunwald E, Pfeffer M A (2003) Left ventricular remodeling and ventricular arrhythmias after myocardial infarction. *Circulation* **107**(20): 2577-82.
120. Lapointe M C, Mendez M, Leung A, Tao Z, Yang X P (2004) Inhibition of cyclooxygenase-2 improves cardiac function after myocardial infarction in the mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**(4): H1416-24.
121. Schaper J, Lorenz-Meyer S, Suzuki K (1999) The role of apoptosis in dilated cardiomyopathy. *Herz* **24**(3): 219-24.
122. Kostin S, Pool L, Elsasser A, Hein S, Drexler H C, Arnon E, Hayakawa Y, Zimmermann R, Bauer E, Klovekorn W P, Schaper J (2003) Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ Res* **92**(7): 715-24.
123. Schaper J and Kostin S (2005) Cell death and adenosine triphosphate: the paradox. *Circulation* **112**(1): 6-8.
124. Tsujimoto Y and Shimizu S (2005) Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**: 1528-34.
125. Schwartz L M, Smith S W, Jones M E, Osborne B A (1993) Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(3): 980-4.
126. Huang J, Nakamura K, Ito Y, Uzuka T, Morikawa M, Hirai S, Tomihara K, Tanaka T, Masuta Y, Ishii K, Kato K, Hamada H (2005) Bcl-xL gene transfer inhibits Bax translocation and prolongs cardiac cold preservation time in rats. *Circulation* **112**(1): 76-83.
127. Ebel H, Bosbach I, Kubin T, Kostin S, Neuhaus H, Müller-Werdan U, Buerke M, Werdan K, Braun T (2007) BMP2 verbessert das Überleben im murinen Herzinfarkt-Modell durch Steigerung der Kontraktilität und Reduzierung der Apoptose. *Clin Res Cardiol* **96**. Suppl.1, V730
128. Ebel H, Bosbach I, Kubin T, Kostin S, Neuhaus H, Müller-Werdan U, Buerke M, Werdan K, Braun T (2007) Kardioprotektive Effekte von BMP2 im murinen Herzinfarkt-Modell. *Med Klinik* **102**: 736.
129. Steinberg S F (1999) The molecular basis for distinct beta-adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes. *Circ Res* **85**(11): 1101-11.
130. Alloatti G, Marcantoni A, Levi R, Gallo M P, Del Sorbo L, Patrucco E, Barberis L, Malan D, Azzolino O, Wymann M, Hirsch E, Montrucchio G (2005) Phosphoinositide 3-kinase gamma controls autonomic regulation of the mouse heart through Gi-independent downregulation of cAMP level. *FEBS Lett* **579**(1): 133-40.
131. Kerfant B G, Rose R A, Sun H, Backx P H (2006) Phosphoinositide 3-kinase gamma regulates cardiac contractility by locally controlling cyclic adenosine monophosphate levels. *Trends Cardiovasc Med* **16**(7): 250-6.

9.Thesen:

1. Der akute Myokardinfarkt ist eine der Haupttodesursachen in den westlichen Industrienationen.
2. Bei einem akuten Myokardinfarkt liegt selbst unter idealen Bedingungen zwischen Infarkt diagnose und kompletter Reperfusion des ischämischen Myokards eine kritische Zeitspanne, in der zusätzliche Verfahren zur Myokardprotektion eingesetzt werden könnten.
3. Diese Arbeit untersucht, inwiefern die Gabe von BMP2 bei Kardiomyozyten unter Stressbedingungen zu protektiven Effekten führt. Um diese Fragestellung zu klären, werden in einem *in-vivo*-Myokardinfarktmodell adulten ICR-Mäusen durch Ligatur der linken Koronararterie (LAD) Myokardinfarkte induziert, nachdem die Tiere 30 Minuten zuvor eine Injektion von BMP2 beziehungsweise PBS erhalten hatten.
4. In den eigenen Experimenten führt die Ligatur der LAD bei adulten ICR-Mäusen zu großen transmuralen Vorderwandinfarkten.
5. Die Applikation von BMP2 verbessert im murinen im Herzinfarktmodell der Maus das Überleben der Versuchstiere in der Akutphase nach LAD-Verschluss. In der Kontrollgruppe zeigen die Tiere mit sehr großen Infarkten in den ersten Stunden nach dem Infarkt eine sehr hohe Letalität, die Gabe von BMP2 führt in dieser Zeit zu einer deutlichen Reduktion der Sterblichkeit.
6. Auf histologischer Ebene schlägt sich dies in dem zunächst paradox erscheinenden Effekt nieder, dass die mittlere Infarktausdehnung der überlebenden Tiere in der BMP2-Gruppe 21 Tage nach dem Myokardinfarkt signifikant größer ist als bei den Kontrolltieren. Dies kann jedoch dadurch erklärt werden, dass nach BMP2-Behandlung auch Tiere mit sehr großen Infarkten überleben, die in der PBS-Vergleichsgruppe bereits früh versterben und daher nicht mit in die Analysen eingehen.
7. Die transmuralen Myokardinfarkte führen im infarkt-fernen Septum interventriculare (*remote myocardium*) zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten.
8. Die infarktgeschädigten Herzen weisen eine vermehrte interstitielle Fibrosierung auf.
9. Aufgrund des besseren Überlebens der akuten Phase des Myokardinfarktes ist am Ende des Beobachtungszeitraums die mittlere Infarktausdehnung bei den überlebenden Tieren in der BMP2-Gruppe gegenüber der PBS-Gruppe signifikant erhöht. Dies schlägt sich übereinstimmend in dem Befund wieder, dass auch die sekundären Veränderungen des *adverse remodelings* (MCSA, ICF) in der BMP2-Gruppe stärker ausgeprägt sind.
10. Zellkulturuntersuchungen ergeben, dass BMP2 bei adulten Kardiomyozyten unter Stressbedingungen protektive Effekte zeigt. Die Vitalität von adulten Kardiomyozyten wird unter Hypoxie bzw. in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) durch BMP2 signifikant gesteigert.

11. Der Zusatz von 200mM H₂O₂ senkt den Anteil vitaler Kardiomyozyten in Zellkulturen und steigert signifikant den Anteil apoptotischer Zellen.
12. Anhaltende Hypoxie (Absenkung des Sauerstoffgehaltes im Inkubator von 21% auf 2% für 48 Stunden) führt bei den Experimenten zu einer signifikanten Abnahme der vitalen Herzmuskelzellen, allerdings unterscheidet sich der prozentuale Anteil der apoptotischen Kardiomyozyten hier nicht von unbehandelten Kontrollkulturen. Hypoxie führt primär zu einem Zelltod durch Onkose.
13. BMP2 führt in Zellkulturen, in denen durch H₂O₂ oxidativer Stress induziert wurde, zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der vitalen Kardiomyozyten und zu einer signifikanten Abnahme der apoptotischen Zellen. BMP2 schützt isolierte adulte Rattenkardiomyozyten demnach vor der durch oxidativen Stress induzierten Apoptose.
14. BMP2 führt in Zellkulturversuchen, in denen Kardiomyozyten unter anhaltender Hypoxie kultiviert werden, zu einem signifikanten Anstieg der vitalen Zellen. BMP2 schützt isolierte adulte Rattenkardiomyozyten vor der durch Hypoxie induzierten Onkose.
15. BMP2 führt bei neonatalen Kardiomyozyten zur Steigerung der spontanen Kontraktionsfrequenz und der Inotropie von elektrisch stimulierten Kontraktionen.
16. Die Gabe von BMP2 könnte daher möglicherweise einen Therapieansatz zur Myokardprotektion darstellen

10. Lebenslauf

Persönlich Daten:

Name : Hillebrand

Geburtsname: Bosbach

Vornamen : Ina Dorothea

Geburtsdatum : 13.02.1981

Geburtsort : Wuppertal

Familienstand: verheiratet

Anschrift : Georg-Cantor-Str. 19, 06108 Halle (Saale)

Schulische und universitäre Ausbildung:

1987-1991 Städtische Gemeinschafts-Grundschule Remscheid-Honsberg

1991-2000 Städtisches Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium Remscheid

2000-2001 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Staatliche Lehranstalt
für technische Assistenten der Medizin

2001-2007 Studium der Humanmedizin, Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

12.9.2003 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)

01.11.2003 Beginn der Promotion

11/2007 Zweites Staatsexamen

28.11.2007 Erteilung der ärztlichen Approbation

Seit 15.01.2008 Assistenzärztin in der Klinik für Plastische- und Handchirurgie /
Brandverletzenzentrum, Berufsgenossenschaftliche Kliniken
Bergmannstrost, Halle

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter der Angabe der Quelle genannt. Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beraterdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Durch den Antragsteller wurden keine früheren Promotionsversuche unternommen.

Ina Dorothea Hillebrand, geb. Bosbach

Halle / Saale den 09.12.2010

11. Danksagungen

Ich danke für die Unterstützung meiner Arbeit Herrn Prof. Braun, Herrn Prof. Werdan und Frau Prof. Müller-Werdan. Frau Dr. Schwarz danke ich herzlich für das von ihr zur Verfügung gestellte BMP2, ohne das meine Experimente nicht hätten durchgeführt werden können.

Ein großer Dank geht an Frau Dr. Hoffmann-Heinroth, die freundlicherweise adulte Rattenkardiomyozyten zu Verfügung gestellt hat, und auch an Frau Prof. Müller-Werdan für die Bereitstellung neonataler Rattenkardiomyozyten für die Zellkulturexperimente. Frau S. Koch danke ich vielmals für die Hilfe bei den Kontraktilitätsmessungen.

Einen besonderen Dank für die große Unterstützung möchte ich den Mitarbeitern des Institutes für Biochemie aussprechen, die Arbeit im Team hat großen Spaß gemacht! Ich bedanke mich herzlich für die Möglichkeit die tierexperimentellen und zytologischen Untersuchungen in dem Institut für Biochemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchführen zu können.

Für eine exzellente Betreuung während des gesamten praktischen Abschnittes und der Beratung bei der schriftlichen Niederlegung dieser Arbeit danke ich besonders Herrn PD Dr. med. habil. Ebel, der viel Geduld bewiesen hat und mir eine große Stütze war.