

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. med. Karl Werdan

Beeinflussung der Herzregeneration im Mausmodell durch Inhibierung von p53-abhängigen Signalkaskaden

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

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

von Katharina Greye,
geboren am 21.01.1983 in Halle/S.

Betreuer: PD Dr. med. habil. Henning Ebelt, Prof. Dr. med. habil. Ursula Müller-Werdan

Gutachter: 1) Prof. Dr. med. Henning Ebelt
2) Prof. Dr. med. Thomas Hollemann
3) PD Dr. med. Sava Costin

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 01.07.2015

Verteidigung: 02.12.2015

Referat

Im Rahmen des kardialen Remodelings nach Myokardinfarkt (MI) wird Herzmuskelgewebe abgebaut und durch kollagenfaserreiches Narbengewebe ersetzt, häufig entwickelt sich im weiteren Verlauf eine Herzinsuffizienz. In der Annahme, dass die Hemmung von p53 die Apoptoserate der Kardiomyozyten (KM) reduzieren und die Mitoserate der Herzmuskelzellen steigern könnte, sollte der Einsatz eines p53-Hemmers möglicherweise zu einer reduzierten Infarktgröße und einer funktionellen Verbesserung der betroffenen Herzen führen.

In dieser Arbeit sollen in einem In-vivo-Experiment an adulten Mäusen die Effekte des p53-Hemmers Pifithrin- α (PFT- α) auf das Postinfarkt-Remodeling und sein Einfluss auf die Apoptose und den Zellzyklus der Zellen des Herzmuskelgewebes nach einem MI genauer untersucht werden. Dazu werden durch einen operativen Verschluss der linken Herzkranzarterie bei den Versuchstieren Myokardinfarkte induziert. Im Anschluss wird der synthetische p53-Inhibitor Pifithrin- α über insgesamt 6 Tage intraperitoneal injiziert. Kontroll-Tiere erhalten eine Injektion von Dimethylsulfoxid (DMSO, Lösungsmittel für PFT- α). Das Überleben der Mäuse wird protokolliert, nach 7 Tagen erfolgt dann eine echokardiographische Kontrolle der Herzfunktion sowie anschließend die Isolierung der Herzen. Neben einem morphologischen Vergleich werden die Herzen histologisch auf die Infarktgrößen und Wanddicken als Parameter des Remodelings untersucht. Immunhistochemisch erfolgt die Bestimmung von Apoptose- und Replikationsraten sowohl der Kardiomyozyten als auch der Nicht-Muskelzellen des myokardialen Gewebes. Zudem wird der Einfluss von PFT- α auf die Expression Apoptose- und Zellzyklus-assoziiierter Gene untersucht.

Die Untersuchungen zeigen im Beobachtungszeitraum signifikant geringere Überlebensraten der mit PFT- α in einer Dosierung von 4,4 $\mu\text{g/g}$ behandelten Versuchstiere, wobei Herzrupturen die Haupttodesursache darstellen. Die Gabe von PFT- α verschlechtert außerdem die Herzfunktion und führt zu einer signifikanten Zunahme der Infarktausdehnung. Dennoch kommt es unter der PFT- α -Behandlung im Infarktgebiet, entsprechend der Hypothese, zu einer signifikanten Reduktion der Apoptoseraten der KM. Allerdings verringert PFT- α die Replikationsraten der Nicht-Muskelzellen im Infarktgebiet. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Gabe von PFT- α nach akutem Myokardinfarkt im Mausmodell zu einer Destabilisierung der sich entwickelnden Narbe und damit dem vermehrten Auftreten von Herzrupturen führt.

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

ABC-Lösung	<i>Avidin DH and Biotinylated horseradish peroxidase H reagents</i>
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
ACS	<i>acute coronary syndrome, akutes Koronarsyndrom</i>
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i>
α -MHC	<i>α-cardiac myosin heavy chain</i>
Area diast.	linksventrikuläre endokardiale Fläche in der Diastole, anhand der Echokardiographieaufnahmen ausgemessen
Area syst.	linksventrikuläre endokardiale Fläche in der Systole, anhand der Echokardiographieaufnahmen ausgemessen
AT	Angiotensin
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl	<i>b-cell-lymphoma</i>
BH	<i>bcl-2 homology</i>
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridine
BSA	bovines Serum-Albumin
CAD	<i>caspase-activated deoxyribonuclease</i>
CDC-2	<i>cell division control protein 2</i>
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>
CKI	<i>cyclin dependent kinase inhibitor</i>
Cyt c	Cytochrom c
DAB	<i>Diaminobenzidine</i>
DEPC-H ₂ O	Diethyl pyro-carbonate-Wasser
Diablo	<i>direct IAP-binding protein with low pI</i>
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dox	Doxorubicin
DR4/5	<i>death receptor 4/5</i>
DTT	Dithiothreitol
EF	Ejektionsfraktion
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Endo G	Endonuklease G
FAC	<i>fraction of area change, Parameter der linksventrikulären Pumpfunktion in der Echokardiographie</i>
FADD	<i>Fas associated via Death Domain</i>
FS	Fraktionelle systolische Durchmesserverkürzung

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GP	Glykoprotein
HS	<i>horse serum</i>
IAP	<i>inhibitors of apoptosis</i>
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
i.p.	Intraperitoneal
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
KM	Kardiomyozyten
KO	Komplikation
LAD	<i>left anterior descending coronary artery</i> , Ramus interventricularis anterior, Hauptast der linken Koronararterie
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LV	linker Ventrikel
LV-MI	Infarktgebiet des linken Ventrikels
LV-NMI	nicht-infarziertes Gebiet des linken Ventrikels
LVAWD	Dicke der linksventrikulären anterioren Wand in der Diastole
LVAWS	Dicke der linksventrikulären anterioren Wand in der Systole
LVIDD	linksventrikulärer Innen-Diameter diastolisch
LVIDS	linksventrikulärer Innen-Diameter systolisch
LVPWD	Dicke der linksventrikulären posterioren Wand in der Diastole
LVPWS	Dicke der linksventrikulären posterioren Wand in der Systole
MI	Myokardinfarkt
MMP	Matrixmetalloproteinase
Nls	<i>nuclear localised</i> , im Kern lokalisiert
NSTEMI	<i>non-ST-elevation infarct</i> , Nicht-ST-Hebungs-Infarkt
OD	<i>optical density</i> , optische Dichte
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PCI	<i>percutaneous coronary intervention</i> , perkutane koronare Intervention
PFT- α	Pifithrin- α
(qRT-) PCR	(quantitative real time-) <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Ketten-Reaktion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Rb	Retinoblastom
RTase	Reverse Transkriptase
RV	Rechter Ventrikel

Rpm	<i>rounds per minute, Umdrehungen pro Minute</i>
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>standard error of the mean, Standardfehler</i>
sFasL	<i>soluble Fas-Ligand</i>
Smac	<i>second mitochondria derived activator of caspases</i>
STEMI	<i>ST-elevation infarct, ST-Hebungs-Infarkt</i>
SV	<i>simian virus</i>
T-Ag	T-Antigen
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TIMP	<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNFR1	<i>TNF receptor 1</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>1</u>	<u>1</u>
<u>Einleitung</u>	
1.1	1
Koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt	
1.1.1	1
Definition und Bedeutung	
1.1.2	2
Ätiologie und Pathogenese des Myokardinfarktes	
1.1.3	3
Folgen des Myokardinfarktes – Remodeling	
1.2	5
Zellzyklus	
1.3	7
Apoptose	
1.3.1	7
Definition, Morphologie, Vorkommen	
1.3.2	8
Molekulare Mechanismen	
1.3.3	11
Apoptose im Herzmuskelgewebe	
1.4	13
P53	
1.5	14
Therapeutische Ansätze bei Myokardinfarkt	
1.6	14
Neue Ansätze zur Therapie des Myokardinfarktes	
1.6.1	15
Experimentelle Ansätze zur Stimulation von Regenerationsprozessen des Herzmuskels	
1.6.2	16
Kardioprotektion durch Apoptosehemmung	
1.6.3	17
Pifithrin- α	
<u>2</u>	<u>20</u>
<u>Zielstellung</u>	
<u>3</u>	<u>21</u>
<u>Material und Methoden</u>	
3.1	21
Mäuse	
3.2	21
Herzinfarktmodell	
3.3	23
Pifithrin- α -Injektion	
3.4	23
Echokardiographie	
3.5	24
Organisolation	
3.6	25
Herstellung der Schnittpräparate	
3.7	25
Trichromfärbung zur Bestimmung von Infarktgrößen und Wanddicken	
3.8	27
Immunhistochemische Analyseverfahren	
3.8.1	27
LacZ-Färbung	
3.8.2	27
Anti-BrdU-Immunfärbung	
3.8.3	28
Anti-aktivierte Caspase 3-Immunfärbung	
3.9	28
Auszählung immunhistochemisch markierter Zellen	
3.10	29
Hämatoxylinfärbung	
3.11	29
Analyse der mRNA-Expression	

3.11.1	Trizol-Methode zur RNA-Isolation	29
3.11.2	Reverse Transkription und quantitative real time-PCR	30
3.12	Statistik	31
3.13	Material	32
<u>4</u>	<u>Ergebnisse</u>	<u>35</u>
4.1	Überlebensanalyse	35
4.2	Echokardiographie	36
4.3	Organisation	37
4.4	Morphometrie	38
4.5	Histologische Bestimmung der Infarktgrößen	39
4.6	Wanddicken	41
4.7	Effekte von PFT- α auf die Apoptose von Kardiomyozyten	43
4.8	Effekte von PFT- α auf die Zellzyklusaktivität von Kardiomyozyten	44
4.9	Zelluläre Zusammensetzung der Infarktnarbe	45
4.10	Analyse der mRNA-Expression von Zellzyklus- und Apoptose- assoziierten Genen	46
<u>5</u>	<u>Diskussion</u>	<u>48</u>
<u>6</u>	<u>Zusammenfassung</u>	<u>62</u>
<u>7</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>63</u>
<u>8</u>	<u>Thesen</u>	<u>73</u>
	Lebenslauf	
	Selbständigkeitserklärung	
	Erklärung über frühere Promotionsversuche	
	Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt

1.1.1 Definition und Bedeutung

In Deutschland ließen sich in den letzten Jahren mehr als 40 % der Todesfälle auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen zurückführen, wobei insbesondere ältere Menschen (> 65 Lebensjahre) betroffen waren. Die koronare Herzkrankheit (KHK) stellt dabei die häufigste Entität dieser kardiovaskulären Krankheiten dar [1, 2].

Unter einer KHK versteht man ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf des Myokards, welches durch stenosierende Erkrankungen der Herzkranzgefäße ausgelöst wird [3]. Demgegenüber ist der Begriff des akuten Koronarsyndroms (ACS) abzugrenzen, welcher nur die unmittelbar lebensbedrohlichen Phasen der KHK beschreibt. Dazu gehören die instabile Angina pectoris, der akute Myokardinfarkt (MI) und der plötzliche Herztod [4, 5]. Anhand des EKG-Befundes hat sich außerdem eine weitere Einteilung des ACS in Gruppen mit ST-Hebung (*ST-elevation infarct* = STEMI) und Gruppen ohne ST-Hebung (instabile Angina pectoris und *non-ST-elevation infarct* = NSTEMI) etabliert, welche unterschiedliche therapeutische Maßnahmen nach sich zieht [4, 6].

Eine Überarbeitung der Definitions- und Diagnosekriterien des akuten MI erfolgte in den letzten Jahren im Konsens verschiedener europäischer und amerikanischer kardiologischer Fachgesellschaften: Der Begriff des Myokardinfarkts sollte demnach nur gebraucht werden, wenn eine myokardiale Nekrose sicher nachgewiesen werden kann und in einem klinischen Rahmen stattfindet, welcher mit einer myokardialen Ischämie vereinbar ist [7]. In der Klinik kann die Diagnose daher durch den Nachweis eines kardialen Biomarkers (vorzugsweise Troponin) in Verbindung mit typischen klinischen Symptomen über mindestens 20 Minuten, infarkttypischen EKG-Veränderungen oder dem Nachweis des Verlusts von vitalem Myokard mittels bildgebender Verfahren gestellt werden [7].

Obwohl die Morbidität, Mortalität und Letalität des Herzinfarkts in den letzten Jahrzehnten – insbesondere durch Therapieveränderungen – in Deutschland rückläufig ist [8], nimmt er weiterhin eine zentrale Rolle unter den Krankheitsbildern der westlichen Industrienationen ein: 2012 wurde die Diagnose „Akuter Myokardinfarkt“ 223 660 Mal in deutschen Krankenhäusern gestellt, davon starben 20 084 Personen [9]. Für das deutsche Gesundheitssystem bedeutete dies in den letzten Jahren jährliche Kosten von mehr als 1,7 Milliarden Euro [10].

Die Verbesserung der Therapieoptionen, basierend auf genauen Kenntnissen der Pathogenese und der Folgen des MI, steht weiterhin im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses.

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese des Myokardinfarktes

Der Myokardinfarkt stellt ein oft unerwartetes, akutes Ereignis dar. Dennoch geht ihm häufig ein über Jahre bis Jahrzehnte andauernder, z.T. auch unbemerkt verlaufender Krankheitsprozess voraus. Das morphologische Korrelat dieses Prozesses bildet sowohl beim Herzinfarkt als auch bei der KHK meist die Arteriosklerose der Herzkranzgefäße.

Aufgrund zahlreicher epidemiologischer und klinischer Untersuchungen wie z.B. der *Framingham*-Studie konnten Risikofaktoren identifiziert werden, welche die Entwicklung arteriosklerotischer Gefäßveränderungen begünstigen [11]. Zu den beeinflussbaren Risikofaktoren gehören die arterielle Hypertension, das Rauchen, die Hypercholesterinämie (insbesondere erhöhtes *low density lipoprotein* [LDL]), Diabetes mellitus, die Hyperurikämie, die abdominalbetonte Adipositas, Stress und eine verminderte sportliche Aktivität. Demgegenüber steht die Gruppe der nicht-beeinflussbaren Faktoren, zu denen man bestimmte genetische Veranlagungen, das Alter und das männliche Geschlecht zählt [11, 12]. In einer internationalen Fall-Kontroll-Studie konnte gezeigt werden, dass mehr als 90 % des zuschreibbaren Risikos, einen MI zu erleiden, auf modifizierbare Risikofaktoren zurückzuführen ist [13].

Hinsichtlich der Mechanismen, die zur Initiierung der Arteriosklerose führen, existieren verschiedene Theorien. Die *response to injury*-Hypothese wurde erstmals 1973 von *Russel Ross* formuliert und seitdem mehrfach modifiziert [14-16]. Sie besagt, dass dem arteriosklerotischen Geschehen eine Schädigung der endothelialen Zellen der Koronargefäße vorausgeht. Diese kann entstehen durch mechanische Faktoren, chronische Hyperlipidämie, Urämie, bakterielle Toxine und verschiedene andere chemische Substanzen wie Homozystein [15]. Die heute als „endotheliale Dysfunktion“ bezeichnete Schädigung ist anfangs aber nicht zwingend durch fassbare morphologische Veränderungen des Endothels gekennzeichnet, sondern beruht vielmehr auf einem Verlust bestimmter Funktionen der Endothelzellen. Als Folge werden spezifische adhäsive Glykoproteine auf der Oberfläche der endothelialen Zellen exprimiert, an welche Monozyten und T-Lymphozyten des Blutes binden können. Außerdem gelangen Lipide in die Arterienwand und werden von den Endothelzellen oder Makrophagen oxidiert. Die Entzündungszellen wandern in die subendotheliale Schicht der Intima, wo die Monozyten zu Makrophagen konvertieren, oxidierte LDL aufnehmen und auf diese Weise sogenannte Schaumzellen bilden. Gleichzeitig werden sowohl vom Endothel als auch von den Entzündungszellen zahlreiche Moleküle wie Wachstumsfaktoren und Zytokine freigesetzt. Dadurch kommt es u.a. zur Migration glatter Muskelzellen aus der Media in die Intima, welche zusammen mit den Lipid-beladenen Makrophagen und den Lymphozyten verantwortlich sind für die früheste mikroskopisch erkennbare Läsion der Arterienwand, die sogenannten *fatty streaks* (= Fettstreifen) [16, 17].

Da die Ursachen der endothelialen Dysfunktion meist chronisch weiterbestehen, kann die Entzündungsreaktion der Arterienwand fortschreiten. Sie wird begleitet von einer Proliferation aller

beteiligten Zellarten und einer fibrösen Umwandlung des Gewebes (fibroproliferative Reaktion). Zuletzt bildet sich eine fibröse Plaque, die aus einem Kern aus Lipiden und nekrotischen Zelltrümmern mit aufgesetzter dünner fibröser Kappe besteht. Im fortgeschrittenen Stadium können sich in der Plaque zusätzlich fragile Gefäße bilden und sie kann kalzifizieren [16, 17]. In diesen vulnerablen Plaques kann es zu Hämorrhagien, Erosionen, Ulzerationen oder Rupturen kommen. Die Plaqueruptur mit anschließender Auflagerung von Thrombozyten stellt dabei das gewöhnliche pathologische Substrat für alle Formen des ACS dar. Bei einem schnellen und vollständigen Verschluss des koronaren Gefäßes, der mindestens 20-40 min anhält, kommt es dabei zum MI, d.h. es erfolgt eine irreversible Muskelschädigung des Herzens in Form einer Koagulationsnekrose [3, 5].

In mehr als 90 % der STEMI kann tatsächlich angiographisch ein Thrombus nachgewiesen werden [3]. Am häufigsten (ca. 50 %) treten transmurale Infarkte bei Verschluss des vorderen absteigenden Astes der linken Koronararterie auf (Ramus interventricularis anterior oder *left anterior descendens* [LAD]), welcher beim Normalversorgungstyp die Vorderwand des linken Ventrikels und einen großen Anteil des Septum interventriculare versorgt [3].

Neben einer primären koronaren Thrombose gibt es weitere, seltene Ursachen des MI. Dazu gehören z.B. Koronarspasmen und Vaskulitiden mit sekundärer Thrombusauflagerung, Dissektionen der Arterienwand und die embolische Koronarokklusion [3, 18].

1.1.3 Folgen des Myokardinfarktes - Remodeling

Nach einem Myokardinfarkt kommt es im Herzen zu komplexen Veränderungen der ventrikulären Architektur, dem „kardialen Remodeling“. Dabei wird die nach der Ischämie des Herzens entstehende Nekrose abgebaut und in einem über Wochen andauernden Prozess durch ein kollagenfaserreiches Narbengewebe ersetzt [19]. Das Remodeling kann sowohl infarzierte als auch nicht-infarzierte Gebiete des Herzgewebes betreffen und beeinflusst nachhaltig die ventrikuläre Funktion und Prognose des betroffenen Patienten [20].

Das Remodeling lässt sich in zwei Phasen einteilen. Die frühe Phase dauert ungefähr drei Tage nach dem akuten MI an und ist durch eine sogenannte Expansion der Infarktzone charakterisiert. Dagegen betrifft die späte Phase den gesamten Ventrikel. Sie beginnt etwa am dritten Tag nach dem Infarkt, und es stehen die Dilatation und Hypertrophie des Herzens im Vordergrund.

Durch das frühe Einwandern von Entzündungszellen in die Infarktzone werden Enzyme aktiviert, welche die intermyozytären Kollagenbrücken spalten und dadurch ein Auseinandergleiten der Kardiomyozyten (KM) begünstigen. Es kommt zu einer Ausdünnung und Elongation des infarzierten Bereiches [19, 20]. Diese Infarktexpansion kann nicht grundsätzlich nach jedem Infarkt beobachtet werden, findet aber verstärkt bei großen transmuralen Infarkten in anteriorer, apikaler Lokalisation statt. Diese Stelle ist gegenüber deformierenden Kräften besonders anfällig, da es die dünnste Stelle des Ventrikels mit der größten Krümmung ist [20].

Die Reduktion des kontraktiven Gewebes führt zu einer verminderten Ejektionsfraktion des linken Ventrikels. Nach dem *Frank-Starling*-Mechanismus wird versucht das Schlagvolumen des Herzens durch eine ventrikuläre Dilatation und einem damit erhöhten enddiastolischen Volumen aufrecht zu erhalten [21].

Ein weiteres physikalisches Gesetz liefert die Erklärung für die entstehende Hypertrophie des Herzgewebes: Das Gesetz nach *Laplace* besagt, dass die Wandspannung proportional mit dem Innendruck und dem Radius des Ventrikels zunimmt, sich aber umgekehrt proportional zur Dicke der Ventrikelwand verhält [20, 21]:

$$\text{Wandstress (-spannung)} = \frac{\text{Innendruck} * \text{Radius}}{2 * \text{Wanddicke}}$$

Eine erhöhte Wandspannung verstärkt die Gefahr der Aneurysmenbildung und von Herzwandrupturen und wird nach einem Infarkt autoregulatorisch möglichst gering gehalten. Da der Innendruck und Radius des Ventrikels durch die Dilatation und das erhöhte enddiastolische Volumen erhöht sind, kann die Wandspannung nur durch eine gleichzeitige Zunahme der Wanddicke durch Myozytenhypertrophie herabgesetzt bzw. konstant gehalten werden. Die Dickenzunahme der Ventrikelwand führt schließlich erneut zu einer relativen Ischämie, da die Wachstumsgeschwindigkeit des kapillären Netzwerkes nicht mit derjenigen der Ventrikelwand mithalten kann. Es entsteht ein *Circulus vitiosus* mit einer progressiven Dilatation der linken Herzkammer, welche auch nach der kompletten Infarktheilung und Narbenbildung anhält [20, 21].

Neben mechanischen Faktoren tragen auch lokale Wachstumsfaktoren und eine neurohormonale Aktivierung zur Myozytenhypertrophie bei. Nach einem MI können erhöhte Spiegel an Katecholaminen, an Hormonen des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems (RAAS) und an natriuretischen Peptiden gemessen werden [19, 22]. Der Sympathikus verstärkt die ventrikuläre Hypertrophie über seine positiv chrono- und inotrope Wirkung am Herzen und durch die Aktivierung der Re-Expression eines fetalen Genprogrammes. Das RAAS versucht den Blutdruck durch eine Vasokonstriktion aufrecht zu erhalten, während die natriuretischen Peptide das *Afterload* durch periphere Vasodilatation und verstärkte Natriuresis reduzieren [19].

Im letzten proliferativen Abschnitt des Remodelings wird das abgebaute nekrotische Material schließlich durch eine kaum dehbare, sehr resistente Narbe ersetzt. Dabei spielt der *transforming growth factor* (TGF-) $\beta 1$ eine Schlüsselrolle für die Gewebereparatur. Er unterstützt u.a. die Fibroblastenproliferation und ihre Transformation in Myofibroblasten, welche das zur Narbenbildung wichtige Kollagen vom Typ I und III synthetisieren [22].

Als Folge des Herzinfarkts entwickeln ca. 25 % der Infarktpatienten im weiteren Verlauf eine Herzinsuffizienz, wobei die Rate nach Reinfarkt wahrscheinlich deutlich höher liegt [23]. Es

konnte sowohl bei Tieren als auch beim Menschen eine direkte Relation zwischen der Größe des Infarktes und der verbleibenden linksventrikulären Funktion gezeigt werden [24, 25]. Die verbleibende ventrikuläre Funktion gibt außerdem Auskunft über die weitere Prognose der betroffenen Patienten. Dabei stellt das endsystolische Volumen der linken Herzkammer den genauesten Parameter zur Vorhersage des Überlebens nach MI dar [26].

1.2 Zellzyklus

Die Aktivität teilungsfähiger Zellen kann durch den Zellzyklus beschrieben werden. Dieser besteht aus fünf verschiedenen Phasen, den drei „Lückenphasen (Gap)“ G0, G1 und G2, sowie der S-Phase und der M-Phase (Abb. 1.) [27]. In der S-Phase erfolgt die Replikation bzw. DNA-Synthese, in der M-Phase die Mitose, und in den Phasen G1 und G2 kommt es zur RNA- und Proteinsynthese der Zelle. Die G0-Phase stellt einen Abschnitt dar, in dem sich die Zelle in einem proliferations-inaktiven Ruhezustand aufhält, aber dennoch das Potential behält, nach Stimulierung wieder in den Zellzyklus einzutreten [27].

Eine wichtige Rolle in der Aktivierung des Zellzyklus spielt die Gruppe der *cyclin dependent kinases* (CDK), Enzyme, welche nur nach Bindung an Cycline wirken können. Die Cyclinkonzentration wird im Gegensatz zu den CDK zellzyklusabhängig reguliert, d.h. in bestimmten Phasen des Zellzyklus erfolgt ein kontrollierter Auf- und Abbau dieser Proteine (Review in [28]).

Nach mitogener Stimulation kommt es zur Akkumulation der D-Typ-Cycline (D1, D2, D3), welche in der frühen G1-Phase an die CDK 4 und 6 binden. Diese Cyclin-CDK-Komplexe fördern die Phosphorylierung der Retinoblastom (Rb)-Pocketproteine, wodurch E2F-Transkriptionsfaktoren freigesetzt und aktiviert werden. Diese wiederum können spezifisch Zielgene, die notwendig für die DNA-Synthese sind, transaktivieren. Unter den Zielgenen befindet sich auch Cyclin E, welches in der späten G1-Phase mit CDK 2 einen Komplex bildet und in dieser Form den Übergang durch den G1/S-Kontrollpunkt bzw. Restriktionspunkt ermöglicht. In der späten S-Phase wird Cyclin E wieder abgebaut und CDK 2 wird nun durch Cyclin A aktiviert, wobei der Cyclin A-CDK 2-Komplex die Zelle durch die S-Phase und in die G2-Phase führt. Schließlich wechselt Cyclin A am Ende der G2-Phase seinen Bindungspartner, wodurch ein Komplex aus Cyclin A und CDK 1 (= *cell division control protein 2 [CDC 2]*) zustande kommt und den Beginn der Mitose ermöglicht. Nach dem Bruch der Kernhülle wird Cyclin A abgebaut und es formiert sich der CDK 1-Cyclin B-Komplex, der während der Mitose und späten G2-Phase mehr als 70 Substrate phosphoryliert [27, 28]. Die Mitose in humanen Zellen dauert nur etwa 30-60 Minuten, während der gesamte Zellzyklus bei teilungsaktiven Zellen bis zu 25 Stunden beansprucht [29].

Neben den Cyclinen als Aktivatoren konnten auch Inhibitoren des Zellzyklus nachgewiesen werden, sogenannte *cyclin dependent kinase inhibitors* (CKI). Hier unterscheidet man zwei

Gruppen: die INK 4-Proteine, welche spezifisch den Cyclin D-CDK 4/6-Komplex hemmen, und die Hemmer der CIP/KIP-Familien wie $p21^{Cip1}$, $p27^{Kip1}$ und $p57^{Kip2}$, welche CDK 2 und die Cycline D, E und A beeinflussen [27].

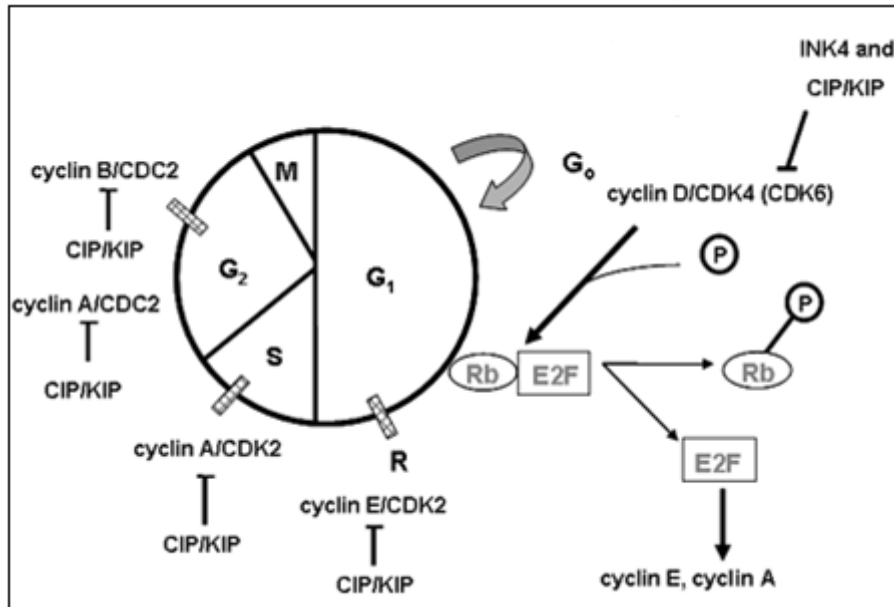


Abb. 1. Zellzyklus (modifiziert nach [30])

Der Zellzyklus findet in vier Phasen statt (G₁-S-G₂-M), alternativ kann die Zelle auch in eine Ruhephase (G₀) übergehen. Die Cyclin-CDK-Komplexe wirken als Aktivatoren des Zellzyklus (Pfeile), die Proteine der INK4- und CIP-/KIP-Familie dagegen inhibieren diese Komplexe (\perp) und damit den Zellzyklus. Durch Phosphorylierung des Rb-E2F-Komplexes kommt es zur Freisetzung von E2F-Transkriptionsfaktoren, was zur Aktivierung von Cyclin E/Cyclin A und zur Überschreitung des Restriktionspunktes führt.

CDK, cyclin dependent kinases; R, Restriktionspunkt; Rb, Retinoblastom-Pocketprotein.

Neben Zellen, die sich in einer der beschriebenen Zellzyklusphasen befinden, gibt es auch teilungsunfähige Zellen, sogenannte terminal differenzierte Zellen. *Ahuja et al.* beschreiben den Begriff der "terminalen Differenzierung" noch genauer: Er umfasst neben dem permanenten Austritt aus dem Zellzyklus auch eine Zelltyp-spezifische Differenzierung, die durch die Heraufregulierung gewebsspezifischer Gene charakterisiert ist [31].

Die Entwicklung von Herzmuskelzellen erfolgt in drei Phasen. Während der späten embryonalen und fetalen Periode kommt es zur Proliferation von kardialen Vorläuferzellen, was mit einer starken Zunahme der Zellzahl einhergeht. Perinatal erfolgt nochmals eine intensive DNA-Synthese und Mitose, aber ohne anschließende Zytokinese (azytokinetische Mitose), was zu einer Binukleation der Zellen führt. Das adulte Herzmuskelgewebe schließlich kann fast nur noch durch eine Zunahme der Zellgröße (*Hypertrophie*) und nicht mehr durch eine Zunahme der Zellzahl (*Hyperplasie*) wachsen. Daher können abgestorbene Kardiomyozyten nach einem

Myokardinfarkt auch nur durch Narbengewebe aus vorwiegend Bindegewebszellen ersetzt werden [31, 32].

Aus diesen Gründen wurden adulte Kardiomyozyten lange ausschließlich als terminal differenzierte Zellen betrachtet, bis sich ab der Mitte der 1990er Jahre Studien häuften, die eine Proliferationsfähigkeit adulter Herzmuskelzellen, wenn auch meist in geringem Ausmaß, nachwiesen [29, 33, 34]. Es gab verschiedene Ansätze zur Quantifizierung der DNA-Synthese sowohl in gesunden als auch in geschädigten Kardiomyozyten (zusammengefasst bei [35]). In einem Experiment an transgenen α -MHC-nLacZ-Mäusen (vgl. 3.1. und 3.8.2.) wurde die DNA-Synthese von Kardiomyozyten mittels Thymidin-Inkorporation gemessen [33]. Dabei ergaben sich Kardiomyozyten-Proliferationsraten von etwa 0,0005 % in gesunden und 0,008 % in geschädigten Herzen. Etwas höhere Werte beschrieben *Beltrami et al.*, welche die Herzen verstorbener Patienten nach MI untersuchten [29]. Hier zeigten sich außerdem signifikant höhere Proliferationsraten an den Randgebieten von Infarkten im Vergleich zu weiter entfernt gelegenen Anteilen des Herzens.

Der Nachweis verschiedener, sowohl residenter als auch zirkulierender Stamm- bzw. Progenitorzellen im Herzmuskelgewebe konnte die Hypothese der Proliferations- und Regenerationsfähigkeit des Herzmuskelgewebes zusätzlich unterstützen [36-39].

Mittlerweile wird allgemein akzeptiert, dass adulte Kardiomyozyten eine gewisse Kapazität zum Wiedereintritt in den Zellzyklus und zur Proliferation besitzen, obwohl die Ansichten in Bezug auf das Ausmaß dieser proliferativen Potenz stark differieren. Es herrscht andererseits aber auch Konsens darüber, dass die intrinsische Regenerationskapazität adulter Säugerherzen nicht ausreichend ist zur Wiederherstellung der kardialen Funktion nach Herzschädigung [40-42]. Daher wird in neuen Therapieansätzen versucht, in die Regulierung des Zellzyklus von Kardiomyozyten einzugreifen, um so die Regeneration des geschädigten Herzmuskelgewebes zu unterstützen (vgl. 1.6.1.).

1.3 Apoptose

1.3.1 Definition, Morphologie, Vorkommen

Der griechische Begriff *Apoptose*, der eigentlich das Herabfallen von Blättern von einem Baum beschreibt (*apo* = weg, *ptosis* = Fall), wurde 1972 erstmals im Zusammenhang mit dem Zelltod verwendet [43]. *Kerr et al.* fassten die z.T. schon im 19. Jahrhundert beobachteten morphologischen Phänomene dieses Zelltods zusammen: Betroffene Zellen lösen sich aus ihrem Zellverband, es kommt zu einer Kondensation von Zellkern und Zytoplasma, das aggregierte Chromatin lagert sich als dichte Masse meist halbmondförmig an die Kernhülle und die Zelle schrumpft (*Pyknose*). Die betroffenen Zellen stoßen Pseudopodien aus (sogenanntes *budding* = Knospung), und es lösen sich Membran-umhüllte Apoptosekörper, welche noch intakte Zellorganellen enthalten. Schließlich werden diese *apoptotic bodies* phagozytiert, was sowohl durch Ge-

websmakrophagen als auch durch parenchymatöse Schwesternzellen erfolgen kann [43, 44]. Die Apoptose erfolgt ohne eine Entzündungsreaktion und ist ein aktiver Prozess, welcher Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) benötigt. Es handelt sich um eine Form des programmierten Zelltods, also um einen genetisch kontrollierten und zeitlich regulierten Prozess [44, 45].

Die Apoptose ist ein ubiquitär verbreiteter Prozess. Sie kommt bei Wirbeltieren in nahezu allen Geweben vor und kann während der perinatalen Entwicklung genauso wie im adulten Organismus beobachtet werden. Im menschlichen Körper sterben täglich 10^7 von insgesamt etwa 10^{14} Zellen durch diese Art des Zelltods [46]. Schon vor 60 Jahren erkannte *Glücksmann*, dass der Zelltod einen physiologischen Prozess in der Entwicklung humaner Gewebe darstellt [47], z.B. sterben bei der Entwicklung des Nervensystems bis zu 50 % der Zellen schon kurz nach ihrer Entstehung wieder ab. Aber auch unter pathologischen Voraussetzungen spielt diese Zelltodart häufig eine bedeutende Rolle: Schädliche Zellen wie Tumorzellen und virusbefallene Zellen können gezielt durch Apoptose vernichtet werden, und auch nach Herz- und Hirninfarkten findet eine verstärkte Apoptose statt [45, 48].

Vom apoptotischen Zellsterben abzugrenzen ist der Zelltod durch Nekrose: Während der Nekrose (griech. *nekros* = Leiche) kommt es im Gegensatz zur Apoptose zu einer Schwellung der Zelle, von der sich auch die oft synonym verwendete Bezeichnung *Onkose* ableitet [44]. Es findet eine frühe Plasmamembranruptur mit Verlust der zellulären Inhalte statt, welche eine starke Entzündungsreaktion nach sich zieht. Die Nekrose benötigt keine Energie in Form von ATP. Neuere Ergebnisse sprechen allerdings gegen ein rein akzidentelles Geschehen, als welches die Nekrose bisher betrachtet wurde [45, 49].

1.3.2 Molekulare Mechanismen

Der transparente Wurm *Caenorhabditis elegans* diente als erstes Modell zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der Apoptose [50] und ermöglichte die Identifizierung der ersten Gene zur Regulierung dieses programmierten Zelltods [51]. In den 1990er Jahren erfolgte schließlich ein starker Erkenntniszuwachs dieser Mechanismen, so dass die Anzahl der Publikationen über die Apoptose stetig stieg.

Im Wesentlichen kann ein *intrinsischer* (mitochondrial-vermittelter) von einem *extrinsischen* (Todesrezeptor-vermittelten) Signalweg bei der Auslösung der Apoptose unterschieden werden (Abb. 2.). Beim *intrinsischen* Apoptoseweg kommt es als Antwort auf verschiedene extra- oder intrazelluläre Stresssignale – wie Hypoxie, DNA-Schädigung, Bestrahlung usw. [52] – zu einer Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren aus dem intermembranösen Raum der Mitochondrien. Zu diesen Substanzen gehören Cytochrom c (Cyt c), Endonuklease G (Endo G), *apoptosis inducing factor* (AIF), *second mitochondria derived activator of caspases/direct IAP-binding pro-*

tein with low p1 (Smac/Diablo) und HtrA2/Omi [53]. Während AIF und Endo G direkt zum Nukleus translozieren und dort an der DNA-Fragmentierung und der Chromatinkondensation beteiligt sind, wirken andere Faktoren regulierend an der induzierten Apoptosekaskade. Omi/HtrA2 und Smac/Diablo sind Serinproteasen, die die Apoptose aktivieren, indem sie Hemmer der Apoptose (*inhibitors of apoptosis* = IAP) inhibieren [54]. Eine Schlüsselrolle spielt Cyt c, das sich mit Procaspase 9 und dem zytosolischen Protein Apaf-1 zum sogenannten *Apoptosom* zusammensetzt. Dies führt zur Aktivierung des Enzyms Caspase 9, welches wiederum Caspase 3 aktiviert [53, 55, 56] (Erläuterung Caspasen: s.u.).

Die bedeutendsten physiologischen Regulatoren der Apoptose und die wichtigsten Regulatoren des mitochondrialen Pfads sind die Mitglieder der *b-cell-lymphoma* (Bcl-) 2-Familie [57]. Sie können in drei Gruppen unterteilt werden: Zu den Vertretern der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine gehören u.a. Bcl-2 selbst und Bcl-XL. Sie enthalten vier hochkonservierte Sequenzregionen, die *bcl-2 homology* (BH)-Domänen 1-4. Bei den pro-apoptotischen Mitgliedern können die „Multi-Domänen-Proteine“ wie Bax und Bak, welche die BH-Domänen 1-3 besitzen, von den *BH3 domain only*-Proteinen wie Bid, Noxa und Puma unterschieden werden. Letztere besitzen, wie der Name verrät, nur die BH-Domäne 3; sie nehmen Todessignale wahr und geben diese an ihre anti-apoptotischen Familienmitglieder weiter. Diese anti-apoptotischen Proteine verlieren daraufhin die hemmende Wirkung, die sie sonst auf Bax und Bak ausüben. Die Funktion der proapoptotischen Proteine Bax und Bak besteht schließlich in der Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran und damit der Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren [58, 59]. Es gibt außerdem das Modell, dass die BH3-only-Proteine Bax und Bak auch direkt aktivieren und damit die Apoptose initiieren können [60]. Vereinfacht gilt, dass das Schicksal der Zelle durch das Verhältnis der pro-apoptotischen zu den anti-apoptotischen Proteinen bestimmt wird [53].

Beim *extrinsischen* Apoptoseweg kommt es zur Aktivierung von Todesrezeptoren der Zelloberfläche, die zur Superfamilie der *tumor necrosis factor* (TNF)-Rezeptoren gehören. Zu den typischen Rezeptoren des Herzens gehören FasR (= CD95 = Apo1) und *TNF receptor 1* (TNFR1) [61], aber auch *death receptor 4 and 5* (DR4 und DR5) [53]. Bei Ligandenbindung an die extrazelluläre Domäne der Rezeptoren ändern diese ihre Struktur, es kommt zur Rekrutierung intrazellulärer Adaptermoleküle (FADD = *Fas associated via Death Domain*) und der *death-inducing signaling complex* (DISC) wird gebildet. Dieser kann nun Procaspase 8, welche selbst auch eine Todesdomäne enthält, spalten und aktivieren. Die aktive Form der Caspase 8 wiederum aktiviert anschließend die Procaspase 3 [56].

Bei den Caspasen handelt es sich um Aspartat-spezifische Cysteinproteasen (*cysteiny-l-aspartate specific proteases*), also Enzyme, die ein Cystein im aktiven Zentrum besitzen und

Peptidbindungen C-terminal von Aspartat spalten [62]. Beim Menschen konnten bis heute 11 Mitglieder (Caspasen 1-10 und 14) identifiziert werden [63], wobei nur etwa zwei Drittel dieser auch in die Apoptose involviert sind [64]. Während der Apoptose wird eine Caspase-Kaskade ausgelöst. Dabei können nach Aufbau und Funktion Initiatorcaspasen mit langer Prodomäne von Effektorcaspasen mit kurzer Prodomäne unterschieden werden. Initiatorcaspasen, wie Caspase 9 im intrinsischen und Caspase 8 im extrinsischen Apoptoseweg, wirken am Anfang dieser Kaskade und sind v.a. für die Aktivierung weiterer Caspasen zuständig. Effektorcaspasen dagegen spalten viele verschiedene Substrate in der Zelle [63]. In Säugerzellen konnten bisher fast 400 Substrate der apoptotischen Caspasen identifiziert werden [65].

Beide bisher beschriebenen Apoptosewege haben ab der Aktivierung der Effektorcaspase 3 eine gemeinsame Endstrecke. Caspase 3 ermöglicht z.B. im Zellkern die enzymatische Aktivität der Endonuklease *caspase-activated deoxyribonuclease* (CAD), indem sie deren Hemmer ausschaltet. Dadurch kann die DNA in Apoptose-typische Fragmente mit einer spezifischen Länge, die ein Vielfaches von 180 bp darstellt, gespalten werden [66, 67].

Vor fast fünfzehn Jahren konnte in einem Experiment an Mäusen nachgewiesen werden, dass Caspase 12 am Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert ist und einen weiteren *ER-spezifischen* Apoptoseweg vermittelt [68]. Das ER hat normalerweise die Funktion, neu synthetisierte Proteine zu falten und zu modifizieren. Gelingt dies nicht, kommt es zum ER-Stress und der sogenannte *unfolded protein response* (UPR) wird in Gang gesetzt. Dieser führt u.a. über die Aktivierung von Caspase 12 zur direkten Aktivierung von Caspase 3 und löst damit die Apoptose aus [69]. Caspase 4 nimmt anscheinend beim Menschen die Rolle der Caspase 12 ein, welche bisher nur im Nager-Modell nachgewiesen werden konnte [70]. Erst vor wenigen Jahren zeigten verschiedene Experimente, dass auch im Herzen nach Hypoxie/Ischämie ER-Stress ausgelöst wird, welcher zum UPR und zur Apoptose führen kann [71, 72].

Insgesamt funktionieren die drei aufgezeigten Apoptose-Wege nicht streng voneinander getrennt, vielmehr gibt es verschiedene Verbindungspfade. Der bekannteste ist die Verknüpfung zwischen dem extrinsischen und dem intrinsischen Signalweg über Bid, ein pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie [64]. Es wird von Caspase 8 zu seiner aktiven Form gespalten und transloziert danach zum Mitochondrium, wo es über eine Beeinflussung anderer Mitglieder der Bcl-2-Familie (Bax, Bak) die Freisetzung von Cytochrom c fördert. Allerdings scheint diese Verlinkung zwischen dem ex- und intrinsischen Apoptoseweg meist nur eine geringe Rolle zu spielen und nur in bestimmten Zellen stattzufinden [58].

Auch für den ER-spezifischen Apoptoseweg wurden sowohl Verbindungen zum intrinsischen als auch zum extrinsischen Apoptosepfad beschrieben [53, 73, 74].

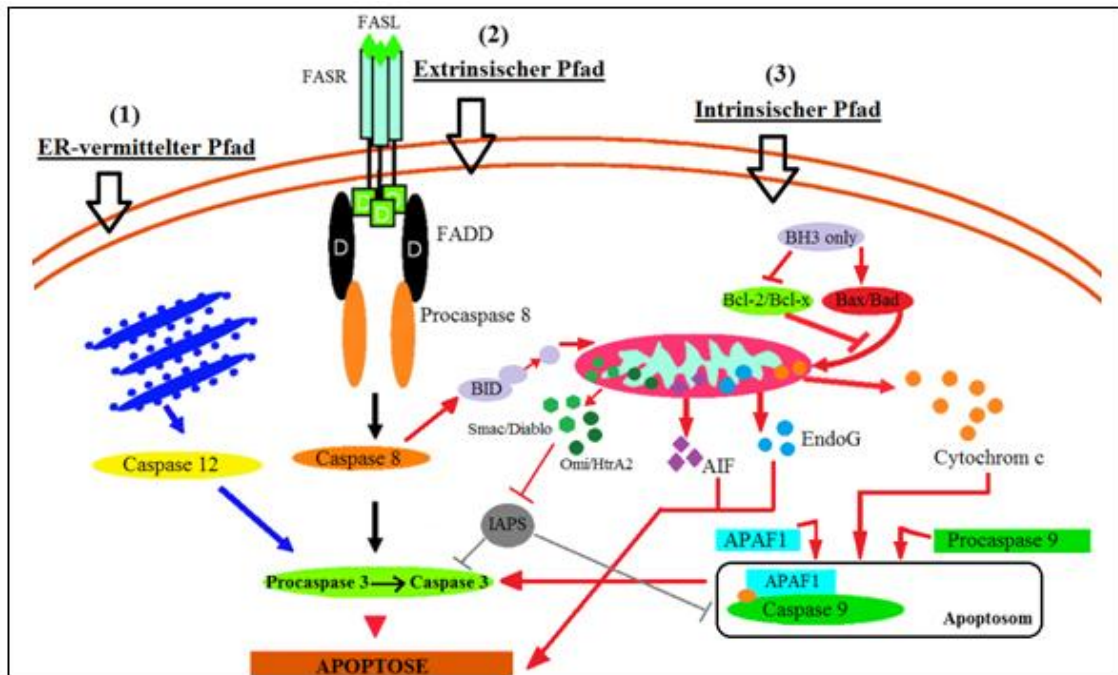


Abb. 2. Apoptosekaskaden (modifiziert nach [75])

(1) ER-vermittelter Pfad: nach ER-Stress wird Caspase 12 aktiviert, die die Aktivierung von Caspase 3 vermittelt; (2) Extrinsischer Pfad: über die Aktivierung von Todesrezeptoren der Zelloberfläche (z.B. FASR) wird Caspase 8 aktiviert, die wiederum Caspase 3 aktiviert; (3) Intrinsischer Pfad: nach intra- oder extrazellulären Stresssignalen kommt es zu einer Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren aus dem Mitochondrium, dies führt zur Bildung des Apoptosoms und zur Aktivierung der Caspase 3. Regulierend wirken hierbei die Mitglieder der Bcl-2-Familie, über BID besteht zudem eine Verbindung zwischen ex- und intrinsischem Pfad.

AIF, *apoptosis inducing factor*; EndoG, Endonuklease G; ER, endoplasmatisches Retikulum; FADD, *Fas associated via Death Domain*; FASL, FAS-Ligand; FASR, FAS-Rezeptor; IAPs, *inhibitors of apoptosis*.

1.3.3 Apoptose im Herzmuskelgewebe

Bevor *Gottlieb et al.* 1994 die Apoptose in einem Kaninchen-Modell der ischämischen Herzkrankheit nachwies, wurde der pathologische Verlust an adulten Myozyten fast ausschließlich der Nekrose zugeschrieben [76]. Mittlerweile wurde die bedeutende Rolle der Apoptose in der Pathogenese des Myokardinfarkts und bei vielen anderen kardiovaskulären Krankheiten erkannt [52]. Eine große Anzahl apoptotischer Zellen konnte nach MI in verschiedenen Tiermodellen [77, 78] und auch am menschlichen Herzen [79-81] nachgewiesen werden. *Kajstura et al.* stellten 1996 sogar die These auf, dass die Apoptose in den ersten Stunden nach einem Infarkt die Hauptform des Zelltodes darstelle und insgesamt für einen Anteil von 86 % am gesamten Verlust von KM nach MI verantwortlich sei [77, 82].

Während die Nekrose v.a. im Infarktgebiet selbst stattfindet, sollen apoptotische Herzmuskelzellen bevorzugt an der Randzone (*adjacent*) des Infarkts lokalisiert sein. Hier wurden beim Menschen Apoptoseraten zwischen 2 und 12 % aller Kardiomyozyten beschrieben [55]. Im Ge-

gensatz zur Nekrose konnten apoptotische Kardiomyozyten aber auch in geringen Mengen im entfernter gelegenen (*remote*) Myokard, welches primär nicht vom Infarkt betroffen ist, gefunden werden [77, 81-83].

Die Apoptose spielt in allen Stadien des Herzinfarkts – in der akuten, der subakuten und der chronischen Phase – eine wichtige Rolle. Nach großen Infarkten fördert sie das Remodeling und trägt zur dauerhaften Herzinsuffizienz bei [52].

Der Höhepunkt des apoptotischen Zellverlusts wird schon in den ersten 6 h des Infarktes erreicht, während die Nekrose erst nach 24 h zu ihrem Maximum ansteigt [77, 80, 82]. Dennoch können noch Tage bis Wochen nach einem MI apoptotische Zellen im Herzmuskelgewebe nachgewiesen werden. Die apoptotischen KM befinden sich auch im subakuten und chronischen Infarktstadium vorwiegend an der Randzone des Infarkts mit einer Häufigkeit, die je nach Studie bei mindestens 0,05 % liegt (Übersicht in [52]).

Der intrinsische Apoptoseweg stellt im Herzen die Hauptform des programmierten Zellverlustes dar. Neben der Ischämie/Hypoxie können auch Reperfusion, oxidativer Stress, der Entzug von Wachstumsfaktoren oder Glucose sowie eine Kalzium-Akkumulation diesen Pfad aktivieren [61]. Zu den Herz-spezifischen Caspasesubstraten zählen α -Aktin, α -Aktinin, α/β -Myosin-Schwere-Kette, Myosin-Leichte-Kette 1 und 2, Tropomyosin und Troponin [55].

Der extrinsische Apoptoseweg wird meist durch eine Ligandenbindung am Membranrezeptor induziert. Die Expression von Fas-Liganden steigt in adulten KM als Antwort auf pathologische Stimuli. Während eine Überexpression dieser Liganden *in vitro* die Apoptose verstärken konnte, führte ein Knockout in Lpr-Mäusen zu geringeren Apoptoseraten und einer verminderten Infarktgröße [55]. Auch TNF- α konnte nach MI sowohl lokal als auch zirkulierend in erhöhten Mengen nachgewiesen werden [53]. Es zeigte sich zudem ein direkter Zusammenhang zwischen der Schwere der Erkrankung und der Menge des zirkulierenden TNF- α [61].

Da in Kardiomyozyten im Gegensatz zu anderen Geweben des Menschen geringere Apoptosezahlen gemessen worden waren, verglich eine Studie die Apoptoseauslösung durch sFasL (= *soluble Fas-Ligand*) in Kardiomyozyten und Leberzellen [84]. Dabei schienen die Zellen des Herzens resistenter gegenüber Apoptosesignalen zu sein, da bei ihnen im Vergleich zu Hepatozyten erst bei 10fach höheren Konzentrationen an sFasL diese Art des Zelltods induziert wurde.

Die Apoptose im Herzen betrifft aber nicht nur Kardiomyozyten, sondern auch interstitielle Zellen wie Neutrophile, Makrophagen, Myofibroblasten und Endothelzellen der Koronarien [85]. Während Entzündungszellen im subakuten Stadium zahlreich in das Infarktgebiet einwandern und am Aufbau des Ersatzgewebes beteiligt sind, besteht das Narbengewebe des chronischen Infarktstadiums nur noch aus wenigen Zellen, wobei Apoptose überwiegend für diesen Zellverlust verantwortlich ist [52, 85, 86].

1.4 P53

Das Kernprotein p53 spielt eine zentrale Rolle in der Regulierung von Zellzyklus und Apoptose. Es ist eines der am häufigsten in der biomedizinischen Forschung untersuchten Proteine und wird oft im Zusammenhang mit malignen Tumoren erwähnt, bei denen die Mutation des für p53 kodierenden Gens eine schlechtere Prognose prophezeit [87]. In mehr als 50 % der humanen Malignome ist p53 inaktiviert und stellt damit die häufigste Krebs-assoziierte Veränderung auf genetischer Ebene dar [88].

Das 53 kD schwere Protein wurde in *Simian-Virus (SV) 40*-transformierten Zellen entdeckt, in denen es mit einem Onkogen, dem *large T-Antigen* interagiert und immunpräzipitiert [89, 90]. Dem vorerst nur in maligne transformierten Zellen beobachteten Protein wurden die Rollen eines virusassoziierten Tumorantigens und eines Onkogens zugesprochen, bis seine eigentliche Funktion als Tumorsuppressor und seine Rolle in gesunden Zellen als „Wächter des Genoms“ entschlüsselt wurde [91]. Dabei wirkt es nach DNA-Schädigung vorwiegend als Transkriptionsfaktor, der an mehr als 500 DNA-Loci mit einer spezifischen Bindungssequenz (*p53 responsive element*) binden kann und das weitere Schicksal der Zellen entscheidend beeinflusst [92].

Levine beschrieb den p53-Pfad genauer und unterteilte ihn in fünf Anteile [93]:

1. Das Netzwerk kann durch verschiedene Stimuli aktiviert werden, dazu gehören DNA-Schäden (durch z.B. γ - oder UV-Strahlung, toxische Substanzen oder freie Sauerstoffradikale), zelluläre Mangelzustände (z.B. Hypoxie, Glukosemangel), Schädigungen des Zellspindelapparates oder auch die Aktivierung von Onkogenen.
2. Verschiedene Mediatoren empfangen diese Signale und beeinflussen die p53-Aktivität, v.a. durch post-translationale Modifizierung des Kernproteins. Das sonst sehr labile Protein mit einer Halbwertszeit von weniger als 20 Minuten wird insbesondere durch eine enzymatische Phosphorylierung stabilisiert und aktiviert.
3. Eine zusätzliche Regulierung erfolgt über bestimmte Zellkernproteine, wobei Mdm2 einen wichtigen p53-Inhibitor darstellt, der gleichzeitig autoregulatorisch von p53 selbst aktiviert wird.
4. Das aktivierte p53-Protein kann zum einen als Transkriptionsfaktor und zum anderen durch direkte Protein-Protein-Interaktion am Mitochondrium wirken (s.u.).
5. Letztendlich kann es verschiedene Zellantworten hervorrufen: einen reversiblen Zellzyklusarrest mit der Einleitung von DNA-Reparaturmechanismen, einen irreversiblen Zellzyklusarrest mit verfrühter Zellalterung oder auch einen programmierten Zelltod in Form der Apoptose.

Vor ungefähr 20 Jahren wurde bekannt, dass p53 in die Apoptose involviert ist [94]. Heute wird es sogar als Hauptmediator der Hypoxie-bedingten Apoptose angesehen [95]. Als Transkriptionsfaktor reguliert es die Expression von Genen, welche sowohl in den ex- als auch in den intrinsischen Apoptoseweg einbezogen sind. Dazu gehören die Membranrezeptoren Fas und DR5,

die Bcl-2-Mitglieder Bax, Noxa, Puma und Bid, Cytochrom c, Apaf-1, verschiedene Caspasen und weitere Faktoren [96]. Die direkte Protein-Protein-Interaktion von p53 wurde erst deutlich später als die Transkriptionsfunktion entdeckt. Hierbei verlässt p53 den Nukleus, um selbst am Mitochondrium zu wirken. Dort reguliert es die Mitglieder der Bcl-2-Familie und führt zuletzt über die Aktivierung von Bak zur Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran [97-99].

Im Zellzyklus kann p53 einen reversiblen oder irreversiblen Arrest vermitteln, wobei die genauen Mechanismen nicht komplett geklärt sind. Das Protein scheint u.a. den Übertritt der Zelle von der G2- in die Mitosephase zu hemmen, inhibitorisch auf positive und aktivierend auf negative Zellzyklusregulatoren zu wirken. Dabei beeinflusst es z.B. die Genexpression von Cyclin B1, CDK 2 und p21 [100].

1.5 Therapeutische Ansätze bei Myokardinfarkt

Die gegenwärtigen Therapieempfehlungen des akuten Myokardinfarkts beinhalten medikamentöse und nicht medikamentöse Behandlungsformen und unterscheiden sich bei Patienten mit STEMI und NSTEMI [4, 6], auf eine detaillierte Schilderung wird an dieser Stelle jedoch nicht eingegangen.

Neben Allgemeinmaßnahmen wie der Oberkörper-Hochlagerung in 30° sollte eine spezielle medikamentöse Therapie erfolgen, die aus der Gabe von Sauerstoff, Acetylsalicylsäure i.v., Heparin i.v., Nitroglycerin s.l. und einer effizienten Schmerztherapie besteht. Je nach Begleitsymptomatik und Kontraindikationen kann außerdem die Gabe von β -Blockern und Antiemetika in Erwägung gezogen werden [6].

Beim nachgewiesenen Verschluss (bzw. einer hochgradigen Stenose) von Koronararterien haben sich drei Behandlungsverfahren zur Reperfusionstherapie etabliert: die perkutane koronare Intervention (PCI), die Thrombolyse sowie die operative Bypass-Versorgung. Diese Verfahren werden durch medikamentöse Interventionen (Thrombozytenaggregationshemmung etc.) komplettiert.

1.6 Neue Ansätze zur Therapie des Myokardinfarktes

Um die Versorgung von Herzinfarktpatienten weiter zu verbessern, wird kontinuierlich nach neuen Behandlungsmöglichkeiten dieser Erkrankung geforscht. Verschiedene innovative Ansätze zielen auf die Verhinderung bzw. Reduzierung des infarktbedingten Myokard-Verlustes ab, andere Strategien fokussieren auf die Regeneration bzw. den funktionellen Ersatz des untergegangenen Gewebes (Einsatz von Stammzellen, Kardiomyoplastie).

In diesem Kontext stellt auch die Hemmung von p53 einen denkbaren Ansatzpunkt dar. Durch Inhibierung von p53 könnte zum einen das Ausmaß der KM-Apoptose nach akutem MI verringert werden, zum anderen könnte hypothetisch durch die Ausschaltung von p53 eine Aktivie-

rung der KM-Proliferation induziert werden und so bereits untergegangenes Herzmuskelgewebe wieder partiell ersetzt werden.

1.6.1 Experimentelle Ansätze zur Stimulation von Regenerationsprozessen des Herzmuskels

Da das adulte menschliche Myokard selbst keine ausreichende Regenerationskapazität besitzt (vgl. 1.2.), werden verschiedene Strategien zur Vermehrung der Kardiomyozytenzahl und zur Reduktion des Narbengewebes nach einer Herzschädigung erforscht.

Die Transplantation von Stammzellen, skelettalen Myoblasten oder Kardiomyozyten stellt dabei einen vielversprechenden Ansatz zur Beeinflussung des Remodelings nach MI dar [101]. Neben der direkten Transplantation von Zellen existieren auch Versuche, mittels Zytokinen endogene Stammzellen zu mobilisieren, so dass sie zur infarzierten Region wandern können, um dort in Kardiomyozyten zu differenzieren bzw. die Regenerationsprozesse zu unterstützen [102].

Trotz umfangreicher Forschungen haben zellbasierte Behandlungskonzepte bislang jedoch nicht den Weg in die klinische Routinebehandlung von Patienten mit Myokardinfarkt gefunden. Es existieren weiterhin Vorbehalte gegenüber diesen Therapieformen, insbesondere werden eine mangelhafte Kenntnis der zugrunde liegenden Wirkungsmechanismen und eine unzureichende Effektivität sowie Sicherheitsbedenken beanstandet [103].

Ein anderer regenerativer Behandlungsansatz ist die Reaktivierung der Zellteilung von bereits differenzierten Kardiomyozyten durch die Induktion des Wiedereintritts der Zellen in den Zellzyklus. Um dies zu erreichen, werden zentrale Regulatoren des Zellzyklus manipuliert.

Die ersten Studien hierzu untersuchten die Überexpression der viralen Onkogene E1A und SV40 T-Antigen (T-Ag) [104, 105]. Hierbei konnte erfolgreich eine Proliferation von KM erzielt werden, wobei E1A aber gleichzeitig auch die Apoptose induzierte. Bei der genaueren Analyse der Wirkungsmechanismen von SV40 T-Ag wurden p53, p107 und p193 als wichtige Bindungsproteine identifiziert [106]. Es wurde angenommen, dass die proliferative Wirkung von SV40 T-Ag nur durch eine funktionelle Antagonisierung der sonst pro-apoptotisch wirkenden Proteine p53 und p193 zustande kommt [107]. In Anlehnung an diese Erkenntnisse veröffentlichten *Nakajima et al.* eine Studie, die die Wirkung von dominant-negativen p53- und p193-Mutanten auf die DNA-Synthese von KM untersuchte [108]. In transgenen Mausmodellen mit Expression dieser Isoformen wurde die Anzahl der KM, die sich in der S- und M-Phase des Zellzyklus befanden, gemessen. Während es ohne vorherige Herzschädigung nicht zur DNA-Synthese kam, befanden sich vier Wochen nach MI bei beiden transgenen Mausstämmen etwa 0,5 % der KM der Grenzzone des Infarkts in der S-Phase, wohingegen bei Wildtyp-Kontrolle lediglich 0,008 % der KM Zeichen der S-Phase-Aktivität aufwiesen. Bei der Expression der dominant-negativen p193-Form kam es zusätzlich in den Herzmuskelzellen des interventrikulären Septums (infarktferner Bereich) zur DNA-Synthese (0,05 % vs. < 0,002 % bei Kontrolle),

welche begleitet war von einer ausgeprägten Reduktion des hypertrophischen KM-Wachstums [108].

Weitere Zielstrukturen zur Reaktivierung des KM-Zellzyklus stellen Cycline und CDK dar. In transgenen Mausmodellen mit einer Überexpression von CDK 2, Cyclin A oder den D-Cyclinen konnte eine Steigerung der DNA-Synthese in den Herzmuskelzellen gemessen werden [31]. *Pasumarthi et al.* untersuchten die D-Cycline genauer [40]. Wurden die einzelnen Isoformen jeweils überexprimiert, kam es ohne eine vorherige Schädigung des Herzgewebes in allen Fällen zu mäßig hohen Raten der KM-DNA-Synthese (0,09–0,26 %). Nach einer Herzschädigung zeigten sich dagegen Unterschiede zwischen den drei D-Cyclinen. Eine besondere Rolle wurde für Cyclin D2 erkannt, das nach Überexpression im Anschluss an eine Koronarroklusion einen starken Anstieg der DNA-Syntheseraten verursachte. Sieben Tage nach dem Infarkt replizierten 1 % aller KM der Infarkttrandzone ihre DNA und auch nach 150 Tagen konnten noch hohe S-Phase-Level gemessen werden. Als Folge daraus kam es zu einem Anstieg der Kardiomyozytenzahl, zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße und das Narbengewebe wurde nahezu aufgelöst [40].

Die genannten Studien zeigen, dass es prinzipiell möglich ist, durch den Eingriff in den Zellzyklus ruhende Herzmuskelzellen zur Proliferation anzuregen und das Remodeling positiv zu beeinflussen. Weitere Möglichkeiten zur Reaktivierung des Zellzyklus bestehen in der Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren wie *c-myc*, den Mitgliedern der Familie der Pocketproteine oder der E2F-Familie (zusammengefasst in [27, 31]). Auch die Überexpression von Wachstumsfaktoren wie *insulin-like growth factor (IGF) 1* [109] und die Hemmung (bzw. *knockout*) der p38 MAP-Kinase [110] als intrazelluläres Signalmolekül führten in verschiedenen Experimenten zu einer gesteigerten DNA-Synthese und einem Anstieg der Myozytenzahl.

Insgesamt stellen die Überexpression von Cyclin D2 und die p53-Hemmung durch Expression dominant-negativer Formen von p193 und p53 die bisher effektivsten Methoden zur Reaktivierung des Zellzyklus nach ischämischer Schädigung der Herzmuskulatur dar. Sie führten in Tierexperimenten zu einer anhaltenden Zellzyklusaktivität verbunden mit einer Verbesserung der gestörten Herzfunktion [111].

1.6.2 Kardioprotektion durch Apoptosehemmung

Nachdem der Beweis erbracht worden war, dass die Apoptose eine essentielle Rolle im Zelluntergang nach einem Myokardinfarkt einnimmt [76], beschäftigten sich viele Studien mit Möglichkeiten der Apoptoseinhibition, um so positive Effekte nach Myokardinfarkt zu erreichen. Die vielfach regulierte Apoptosekaskade bietet dabei eine Fülle an potentiellen Angriffspunkten. Trotz zahlreicher Untersuchungen schafften jedoch bisher nur wenige Substanzen den Einzug in die klinische Prüfung.

Caspase-Inhibitoren bilden die wahrscheinlich am häufigsten untersuchte Gruppe der Apoptosehemmer und befinden sich z.Z. in frühen Phasen klinischer Studien [112]. Sie wirken als Pseudosubstrate der aktiven Caspasen und damit als kompetitive Inhibitoren, entweder spezifisch auf nur bestimmte Caspasen oder unspezifisch auf eine Vielzahl von Caspasen [113]. Der zuerst entdeckte natürlich vorkommende Caspasehemmer wurde zu Beginn der 1990er Jahre aus einem Kuhpockenvirus isoliert [114]. Mittlerweile gibt es aber auch synthetisch hergestellte Mitglieder dieser Gruppe. In verschiedenen Studien *in vitro* und *in vivo* konnte eine kardioprotektive Rolle für Caspasehemmer belegt werden [115, 116]. Dennoch wird ihr Potential für einen klinischen Einsatz kontrovers diskutiert [85, 117-119].

Bestimmte Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF- β und IGF-1 vermitteln ihre anti-apoptotische Wirkung, indem sie Rezeptoren der Kardiomyozytenmembran aktivieren. Diese leiten das Signal an intrazelluläre Strukturen weiter, wobei das Mitochondrium ein häufiges Endziel dieses Signaltransduktionsweges darstellt [120]. Die Wachstumsfaktoren werden nach myokardialer Ischämie meist von den Herzmuskelzellen selbst freigesetzt und haben eine große Bedeutung für den Heilungsprozess des Infarktgebietes und das ventrikuläre Remodeling (vgl. auch 1.1.3.) [121, 122]. Durch exogene Zufuhr kann die Konzentration der Wachstumsfaktoren erhöht werden, was auch deren kardioprotektive Wirkung steigert [123, 124].

Auch der Apoptoseregulator Bcl-2 kommt natürlicherweise in der Zelle vor (vgl. 1.3.3.). Seine Überexpression im transgenen Mausmodell führte nach MI zur Apoptosereduktion und verringerte signifikant die Infarktgröße [125, 126]. Ebenso nimmt man auch bei β -Blockern und Hemmern des RAAS, die heute zur Standardtherapie der Herzinsuffizienz nach MI gehören, eine Beeinflussung des Remodeling durch die Hemmung der Apoptose an [52].

Apoptosehemmende Funktionen nach MI wurden außerdem bei Antioxidantien [127], dem Hormon Erythropoetin [128], dem Hitzeschockprotein Hsp70 [129] und vielen weiteren Substanzen beobachtet.

1.6.3 Pifithrin- α

Wissenschaftler von der *University of Illinois* (Chicago) beschrieben im September 1999 erstmalig die Substanz *2-(2-Imino-4,5,6,7-tetrahydrobenzothiazol-3-yl)-1-p-tolyethanone hydrobromide* (Abb. 3.) [130]. Der als stabil und wasserlöslich charakterisierte Heterozyklus mit einem Molekulargewicht von 367 wurde aus einer Bibliothek von rund 10 000 synthetisch hergestellten Substanzen als Hemmer des Tumorsuppressors p53 ausgewählt. In Anlehnung an seine Funktion und den englischen Ausdruck *p53 (fifty-three)-inhibitor* wurde dieser Wirkstoff *Pifithrin- α* (*PFT- α*) genannt [130].

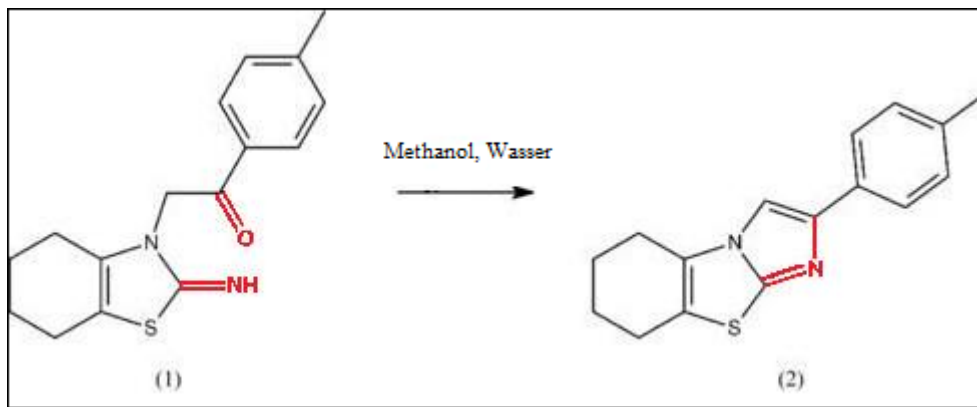


Abb. 3. Pifithrin (modifiziert nach [131])

(1) Pifithrin- α , Kurzformel: $C_{16}H_{18}N_2OS \cdot HBr$, zerfällt bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ in sein Kondensationsprodukt (2) Pifithrin- β , Kurzformel: $C_{16}H_{16}N_2S$.

Bei in-vivo-Experimenten konnte das Überleben von Mäusen nach einer Ganzkörperbestrahlung, welche ohne die Substanz in 60 % der Fälle letal endete, durch PFT- α verbessert werden. Auch in vitro zeigten sich protektive Effekte von PFT- α nach Applikation verschiedener Zytostatika, nach UV- und nach γ -Strahlung, welche auf die Hemmung der durch p53 ausgelösten Apoptose zurückzuführen waren [130].

Neben der Reduktion von Nebenwirkungen einer Tumorthherapie auf das primär gesunde Gewebe wurde über weitere mögliche klinische Anwendungsgebiete nachgedacht [132], und eine Vielzahl klinischer Studien untersuchte die Effekte von PFT- α auf verschiedene Gewebe unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.

Es wurde vermutet, dass PFT- α neuroprotektive Wirkungen i.R. von Morbus Parkinson, Infarkten und bei Subarachnoidalblutungen habe [133-136], aber auch Leber- und Nierenzellen vor Schäden durch toxische Substanzen oder Ischämie schützen könne [137-140]. Ergebnisse anderer Studien sprachen außerdem für seine Rolle in der Regulierung der endothelialen Wundheilung [141] und von Entzündungsreaktionen [142, 143].

Die Forschungsgruppe um *Liu* beschäftigte sich erstmals mit der Wirkung des p53-Hemmers am Herzen. In ihren ersten Versuchen am Mausmodell und an Zellkulturen wurde durch das kardiotoxisch wirkende Chemotherapeutikum Doxorubicin eine experimentelle Schädigung der Herzmuskelzellen ausgelöst und die Effekte einer gleichzeitigen PFT- α -Gabe untersucht [144]. Dabei kam es unter Verabreichung der Substanz zu einer Verbesserung der kardialen Funktion und zu einem vermehrten Zellüberleben. In einem weiteren Experiment derselben Arbeitsgruppe wurde mittels einer LAD-Ligatur eine 30minütige Ischämie an Rattenherzen erzeugt, gefolgt von einer Reperfusion über 4 h [145]. Die PFT- α -Gabe verbesserte auch hier die Herzfunktion und verminderte sowohl die Apoptose als auch die Infarktgröße. Ähnliche Effekte konnten auch 2008 in einer dritten Serie von Experimenten am Herzen beobachtet werden [143], in der bei

sonst gleichem Versuchsaufbau die Reperfusionzeit auf 24 h verlängert wurde. Auch hier kam es unter PFT- α zu einer verminderten Myozytenapoptose und zu einer Reduktion des Infarktgebiets, zudem wurde eine verringerte Leukozytenzahl im ischämischen Gebiet gemessen.

Trotz der Vielfalt an Untersuchungen zur Wirkungsweise von PFT- α ist diese bis heute nicht eindeutig geklärt. Die ersten Experimente zeigten, dass die Substanz die Menge des nukleären, nicht aber die des zytoplasmatischen p53, verringerte [130]. Später wurden Effekte auf die Stabilität des nukleären p53 und eine Beeinflussung der Translokation von p53 zwischen Zytoplasma und Zellkern diskutiert [146]. Die Expression verschiedener p53-abhängiger Genprodukte konnte durch PFT- α gehemmt werden, dazu gehörten die pro-apoptischen Proteine Bax, Puma und Caspase 3, aber auch die an Zellwachstum und Zellzyklus beteiligten Substanzen Cyclin G und p21 [130, 146, 147]. Im weiteren Verlauf wurden außerdem p53-unabhängige Wirkungen der Substanz beschrieben, z.B. die Bindung an Rezeptoren von Glucocorticoiden und Hitzeschockproteinen [148].

Genauere Untersuchungen der Eigenschaften von PFT- α zeigten ein sehr enges therapeutisches Fenster dieser Substanz mit maximalen nicht-toxischen Konzentrationen von 10 $\mu\text{mol/l}$ [131]. Außerdem erfolgte ein in-vitro-Nachweis, dass Pifithrin- α bei 37 °C instabil ist und in sein Kondensationsprodukt Pifithrin- β zerfällt, und es ließen sich alle in-vitro-Effekte auf eine Mischung dieser beiden Substanzen zurückführen (Abb. 3.) [131].

Insgesamt hat Pifithrin- α sowohl p53-abhängige als auch p53-unabhängige und sowohl prä- als auch postranskriptionale Wirkungen [146, 149].

2 Zielstellung

Das Kernprotein p53 kann nach einem Myokardinfarkt die Apoptose induzieren, während sein Inhibitor PFT- α in verschiedenen Gewebetypen diese Form des programmierten Zelltods verhindern konnte. Es existieren nur wenige Untersuchungen zur Wirkung von PFT- α auf das Herzmuskelgewebe, und es gibt keine Studien, die sich mit den Effekten von PFT- α beim chronischen MI beschäftigen.

In dieser Arbeit soll in einem in-vivo-Modell an Mäusen die kardioprotektive Potenz des p53-Hemmers PFT- α im Myokardinfarktmodell untersucht werden. Es sollen der Einfluss von PFT- α auf das Überleben nach Infarkt bestimmt und die Veränderungen des myokardialen Remodeling erfasst werden. Die Auswirkungen auf die Herzfunktion sollen mittels Echokardiographie untersucht werden, und es erfolgt eine histologische Quantifizierung der Infarktgrößen. Immunhistochemische Untersuchungsmethoden sollen der Bestimmung von Replikations- und Apoptoseraten der KM dienen. Da p53 einen Transkriptionsfaktor darstellt, wird mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) die Expression von Apoptose- und Zellzyklus-assoziierten Genen in diesem Modell untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Mäuse

Die Versuche erfolgen an transgenen α -MHC-*nlsLacZ*-Mäusen. Der α -MHC-*nlsLacZ*-Stamm wurde von L. J. Field (Indianapolis, USA) zur Verfügung gestellt.

Der transgene DNA-Strang enthält den α -cardiac myosin heavy chain (α -MHC)-Promoter, welcher genutzt wird, um eine im Kern lokalisierte (*nuclear localised* = *nls*) β -Galaktosidase zu exprimieren. Dadurch können die Kardiomyozytenkerne der transgenen Mäuse anhand der LacZ-Färbung (vgl. 3.8.1.) oder durch den *anti-LacZ-Immunoassay* leicht identifiziert werden. Die transgenen Mäuse sind nur heterozygot lebensfähig, für die Experimente werden ICR-Mäuse als Hintergrund verwendet (Züchter: Harlan-Winkelmann).

Um geschlechtsspezifische Unterschiede ausschließen zu können, werden nur männliche Tiere verwendet. Es handelt sich um adulte Mäuse im Alter von 3,5 bis 12 Monaten mit einem Ausgangsgewicht zwischen 35 g und 50 g. Die Tiere werden ab Beginn des Experiments einzeln in Standardplastikkäfigen des Typs 2 (Grundfläche 360 cm², Höhe 14 cm) gehalten. Die Tiere erhalten als Futter ALTROMIN Standard-Diät 1320 (Altromin Gesellschaft für Tierernährung GmbH, Lage, Deutschland) und Wasser ad libitum. Sie sind einem Hell-Dunkel-Wechsel alle 12 Stunden ausgesetzt, die Stalltemperaturen liegen zwischen 20 und 24 °C und die relative Luftfeuchte beträgt 50–70 %. Jede einzelne Maus ist eindeutig identifizierbar durch Ohrmarkierungen, die unter Narkose gesetzt werden.

Die Tierhaltung erfolgt unter Einhaltung aller gesetzlichen Regelungen einschließlich des Tierschutzgesetzes. Die Versuche an lebenden Tieren wurden angezeigt und genehmigt vom Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt, Referat für Veterinärangelegenheiten.

3.2 Herzinfarktmodell

Um bei den Mäusen einen Myokardinfarkt zu induzieren, wird in Anlehnung an Beschreibungen der Literatur [150-152] eine chirurgische Ligatur der LAD durchgeführt.

Vor Beginn der Operation wird das Ausgangsgewicht der Mäuse ermittelt. Es erfolgt eine orotracheale Intubation und der Anschluss an ein Beatmungsgerät (*MiniVent*, Hugo Sachs Elektronik). Die Inhalationsnarkose wird mit einem Isofluran (5 %)-Sauerstoff (95 %)-Gemisch eingeleitet und mit einem Isofluran-Anteil von 2,5 % aufrechterhalten. Die Ventilation erfolgt volumenkontrolliert mit 200 Beatmungszügen/Minute.

Zur Analgesie wird einmalig präoperativ Carprofen in einer Konzentration von 5 μ g/g Körpergewicht (KG) subkutan injiziert.

Präoperativ wird die Maus auf einem auf 38 °C vorgewärmten Operationstisch fixiert, und das Operationsfeld wird desinfiziert. Anschließend werden die narkotisierten Tiere über dem linksseitigen Thorax rasiert, und es erfolgt ein Hautschnitt in Höhe des vierten Interkostalraumes pa-

rallel zum Rippenverlauf. Die darunter liegende Muskulatur (Musculi pectorales major et minor) wird stumpf abgetrennt, mit Fäden zur Seite gezogen und fixiert. Als nächster Schritt wird der Thorax unter Durchtrennung der Musculi intercostales im vierten linken Zwischenrippenraum eröffnet. Die Lunge wird vorsichtig seitwärts geschoben, und das Herz kann nach Eröffnung des Perikards freigelegt werden. Unter mikroskopischer Sicht erfolgt die Ligatur der LAD proximal seiner Hauptaufzweigungen mittels eines 6-0-Prolene-Fadens. Die Ligatur wird als erfolgreich angesehen, wenn die anteriore Wand des linken Ventrikels verblasst, die Kontraktivität an dieser Stelle abnimmt und die LAD sich distal der Ligatur livide verfärbt.

Nach dem Eingriff wird die Wunde in drei Schichten vernäht. Zuerst werden die Rippen adaptiert, danach die Muskulatur und zuletzt die Haut. Anschließend erfolgt die Extubation, und die Mäuse gelangen in ihrem Käfig langsam wieder zu Bewusstsein.

In den folgenden sechs Tagen erhalten die Tiere intraperitoneale (i.p.) Injektionen von PFT- α , DMSO (= Dimethylsulfoxid) und BrdU (= 5-Bromo-2'-deoxyuridine, vgl. 3.3.) bevor ihre Herzfunktionen am siebten postoperativen Tag mittels Echokardiographie (vgl. 3.4.) untersucht wird. Anschließend werden die Mäuse getötet und ihre Organe isoliert (vgl. 3.5. und Abb.4.).

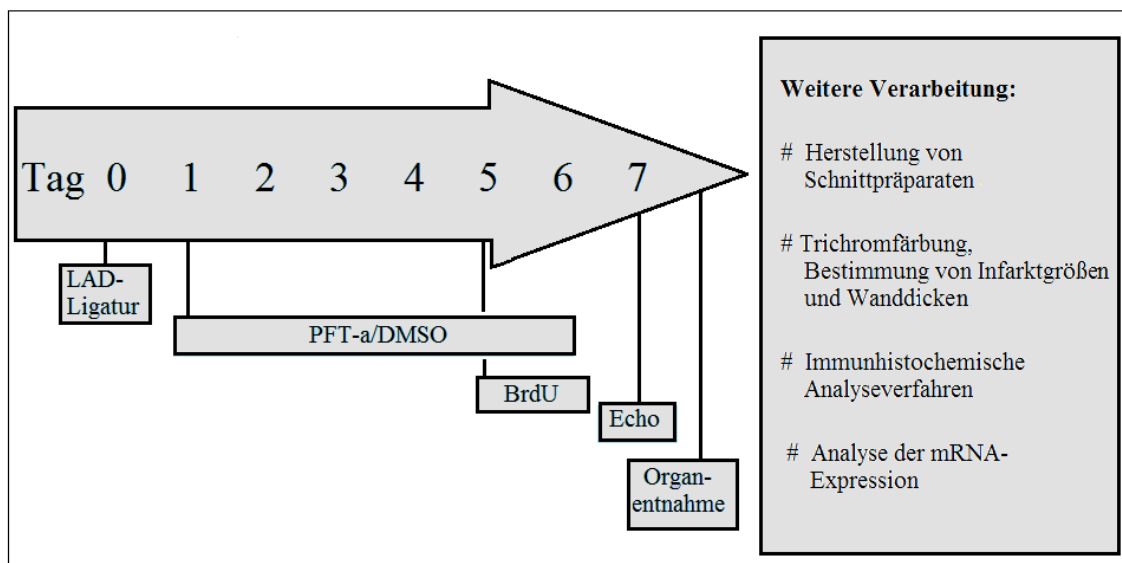


Abb. 4. Zeitlicher Ablauf der Experimente

Zu Beginn erfolgt die LAD-Ligatur, der sich vom ersten bis zum sechsten postoperativen Tag die PFT- α - bzw. DMSO-Gabe (Kontrollgruppe) anschließt. Am fünften und sechsten Tag erhalten die Mäuse BrdU i.p., am siebten Tag erfolgt die Echokardiographie und im Anschluss schließlich die Organentnahme. Die isolierten Organe werden eingefroren und weiter verarbeitet.

BrdU, 5-Bromo-2'-deoxyuridine; DMSO, Dimethylsulfoxid; Echo, Echokardiographie; LAD, left anterior descendens; i.p., intraperitoneal; PFT- α , Pifithrin- α .

3.3 Pifithrin- α -Injektion

Nach der LAD-Ligatur werden die Mäuse zufällig auf die Kontroll- und die PFT- α -Gruppe verteilt. Vom ersten bis zum sechsten postoperativen Tag erhalten die Tiere einmal täglich eine intraperitoneale Injektion von PFT- α (Behandlungsgruppe, n = 28) oder DMSO (Kontrollgruppe, n = 21).

PFT- α wird entsprechend den Angaben des Herstellers zu einer Konzentration von 10 mg/ml in DMSO gelöst. Ein Teil der Mäuse der PFT- α -Gruppe erhält eine Dosis von 2,2 $\mu\text{g/g KG}$ (= 4,4 $\mu\text{l/g KG}$, n = 22), der andere Teil eine höhere Dosis von 4,4 $\mu\text{g/g KG}$ (= 8,8 $\mu\text{l/g KG}$, n = 6). Die Tiere der Kontroll-Gruppe bekommen analog eine DMSO/PBS-Dosis von 4,4 $\mu\text{l/g KG}$ appliziert (DMSO 20fach verdünnt in PBS, PBS = *phosphat buffered saline*).

Zusätzlich erfolgt bei allen Mäusen am fünften und sechsten postoperativen Tag eine intraperitoneale Injektion von BrdU (100 mg/kg KG), was die spätere Darstellung der DNA-Replikationsphase mittels Anti-BrdU-Immunfärbung ermöglicht (vgl. 3.8.2.).

3.4 Echokardiographie

Die Echokardiographie der Mäuse wird am siebten postoperativen Tag unter Isofluran-Inhalationsnarkose (1,5 %) und Spontanatmung durchgeführt, wie dies bereits zuvor von der Arbeitsgruppe publiziert wurde [152], wobei der Untersucher im Hinblick auf die jeweilige Behandlung der Mäuse verblindet ist. Die Aufnahmen erfolgen transthorakal in der parasternalen kurzen Achse. Verwendet wird ein Ultraschallgerät mit einem kleinen Sektor-Schallkopf (*PowerVision*, Toshiba 10 MHz). Alle Messungen werden als Triplikat durchgeführt.

Anhand der M-Mode-Einstellung werden zusätzlich zu den Parametern der LV-Geometrie und -Funktion auch die Herzfrequenz bzw. die Periodendauer der Herzaktionen ermittelt. Außerdem erfolgt die Messung des linksventrikulären Innendiameter systolisch (LVIDS) und diastolisch (LVIDD), der Dicke der anterioren Wand des linken Ventrikels in der Systole (LVAWS) und der Diastole (LVAWD) und der Dicke der posterioren Wand systolisch (LVPWS) und diastolisch (LVPWD).

Ergänzend erfolgt die Bestimmung der fraktionellen systolischen Durchmesserverkürzung (FS) anhand folgender Formel:

$$\text{FS [\%]} = \frac{(\text{LVIDD} - \text{LVIDS}) * 100}{\text{LVIDD}}$$

In der B-Mode-Einstellung erfolgt mittels Cursor eine manuelle Markierung und Ausmessung der linksventrikulären endokardialen Fläche in der Systole (Area syst.) und der Diastole (Area diast.).

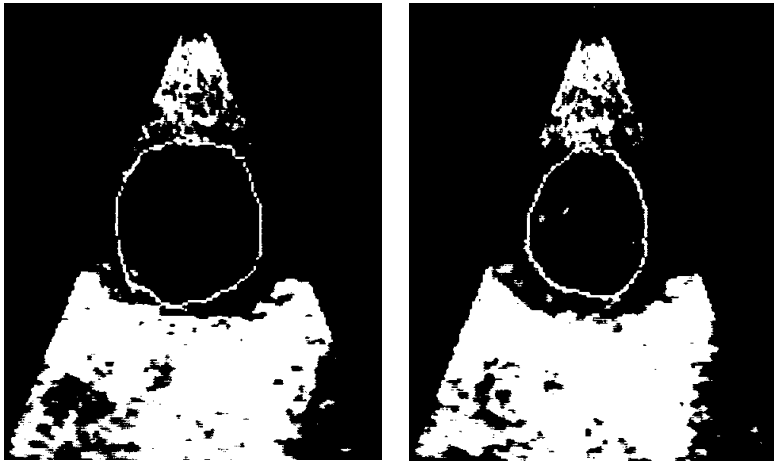


Abb. 5. B-Mode-Echokardiographie

Aufnahme während eines Herzzyklus in der parasternalen kurzen Achse am siebten Tag nach LAD-Ligatur. Manuelle Markierung der Endokardkontur diastolisch (links) und systolisch (rechts).

Anhand dieser Flächen kann die systolische Verkleinerung der linksventrikulären Fläche im Kurzachsenschnitt (*fraction of area change* = FAC) berechnet werden:

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

3.5 Organisation

Im Anschluss an die Echokardiographie erfolgt am siebten Tag nach der LAD-Ligatur die Organisation. Die Tiere werden durch Genickbruch getötet und ihr Gewicht wird am Ende der Behandlungsperiode ermittelt.

Die Hautinzision zur Organisation erfolgt medial in der Längsachse des Thorax. Die Bauchhöhle wird eröffnet und die Leber unter Erhalt aller Leberlappen heraus präpariert. Anschließend wird der Thorax eröffnet, die Lunge wird von Trachea und Ösophagus gelöst, das Herz von verbundenen Gefäßen getrennt und beide Organe werden isoliert. Alle Organe werden in PBS gesäubert und anschließend gewogen, zusätzlich wird die Länge der Tibia gemessen.

Die Herzen werden über Nacht bei 4 °C in einer 30-prozentigen Saccharose/PBS-Lösung aufbewahrt, am darauf folgenden Tag vertikal in *Polyfreeze Tissue Freezing-Medium* eingebettet und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

Die Herzen, die im weiteren Experiment der RNA-Analyse dienen sollen (vgl. 3.11.), werden unter mikroskopischer Sicht in den rechten Ventrikel (RV), das Infarktgebiet (LV-MI) und das nicht-infarzierte Gebiet (LV-NMI) des linken Ventrikels aufgeteilt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.6 Herstellung der Schnittpräparate

Aus den bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrten Herzen werden mittels eines Gefrierschnittkryotoms Schnittpräparate angefertigt, welche anschließend auf beschichtete Objektträger aufgezogen werden. Die Beschichtung der Objektträger erfolgt nach Angaben des Herstellers *VECTOR Laboratories*.

Auf jeden Objektträger werden vier Schnitte aufgezogen. Dabei werden abwechselnd zwölf Schnitte (entsprechend drei Objektträger) mit einer Dicke von $50\text{ }\mu\text{m}$ und zwölf Schnitte mit einer Dicke von $10\text{ }\mu\text{m}$ angefertigt.

Zuletzt werden die Objektträger mindestens eine Stunde lang getrocknet, bevor sie erneut bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Bearbeitung gelagert werden.

3.7 Trichromfärbung zur Bestimmung von Infarktgrößen und Wanddicken

Um die Infarktgrößen der verschiedenen Mäuseherzen vergleichen zu können, müssen Schnittpräparate aus denselben Ebenen der Herzen gewählt werden. Dazu wird in jedem Herz mikroskopisch die Position von Apex und Mitralklappe ermittelt. Es werden die Schnitte ausgewählt, die das Herz in fünf gleich große Abschnitte unterteilen. Der Schnitt aus Position 1 unterteilt das apikale und apikomediale Herzsegment, Position 2 ist zwischen dem apikomedialen und dem medialen Segment lokalisiert, Position 3 zwischen dem medialen und mediobasalen und der Schnitt der 4. Position trennt das mediobasale und basale Segment (Abb. 6.).

Durch die Trichromfärbung sollen Kollagenfasern des Infarktgebietes und intaktes Muskelgewebe voneinander unterschieden werden. Die vier Schnitte (vier Positionen) pro Herz werden nach Angaben des Herstellers *Sigma Diagnostics* gefärbt: Die Objektträger werden zu Beginn $2 \times 10\text{ min}$ in PBS-Lösung gewaschen, dann für 15 min im Brutschrank in der auf $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgeheizten *Bouin's Solution* fixiert und anschließend unter Wasser gespült und kurz in deionisiertes Wasser eingetaucht. Als nächstes werden die Präparate 5 min in *Biebrich Scarlet Acid Fuchsin* angefärbt und erneut in deionisiertes Wasser getaucht. Das Wasser wird dabei solange gewechselt, bis es klar (ohne rötliche Anfärbung) aussieht. Im Anschluss werden die Objektträger in eine frisch hergestellte *Phosphotungstic/Phosphomolybdic Acid Solution* (*Phosphotungstic* plus *Phosphomolybdic* plus deionisiertes Wasser im Verhältnis 1:1:2) getaucht. Im nächsten Schritt werden die Präparate 5 min in *Aniline Blue Solution* gegeben und direkt im Anschluss 2 min in Essigsäure (1 %). Zuletzt folgt die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils

30 s in 70 % und 96 % Ethanol) und in Xylol (2x 30 s). Die Objektträger werden mit Entellan und einem Deckgläschen abgedeckt.

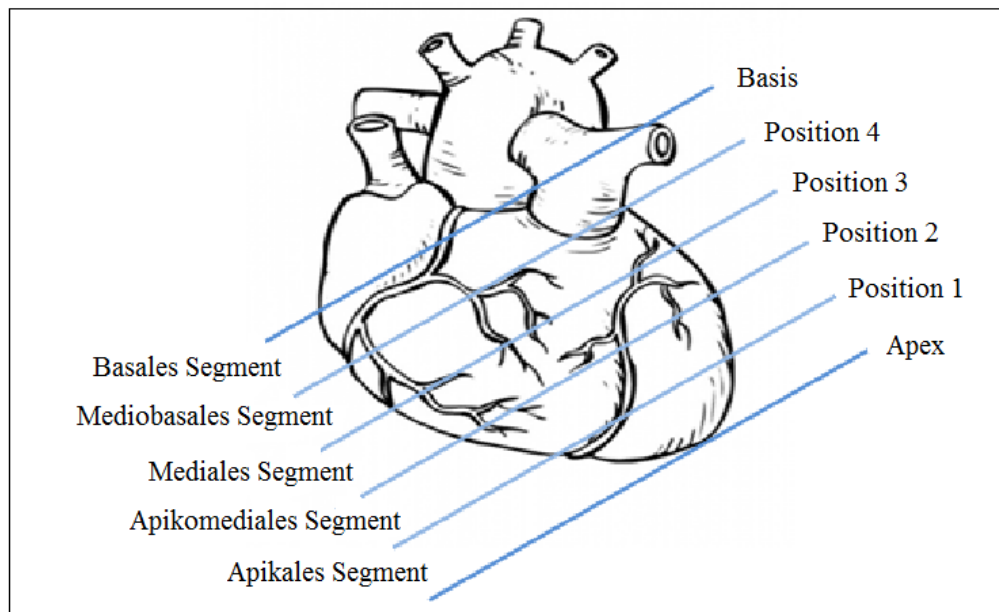


Abb. 6. Zur besseren Vergleichbarkeit wird jedes Herz in fünf Segmente mit gleichem Abstand zwischen Herzbasis und -spitze unterteilt. Von Apex Richtung Basis können so die Schnittebenen bzw. Positionen 1 bis 4 unterschieden werden (modifiziert nach [153]).

Die fertig gefärbten Schnitte können mit einer an ein Lichtmikroskop angeschlossenen Digitalkamera fotografiert werden. Die Bilder werden mittels des Programms *Adobe Photoshop* in die richtige Bildgröße und Auflösung formatiert und anschließend mit dem Programm *Scion Image* vermessen. Dazu wird manuell mit dem Cursor die Strecke des Infarktgebietes und des nicht-infarzierten Gebietes des linken Ventrikels am Endokard und Epikard entlang ausgemessen. Abschließend wird bei allen Herzen die Infarktausdehnung folgendermaßen berechnet:

$$\text{Infarktgröße [\%]} = \frac{(\text{endokardiale Infarktlänge LV} + \text{epikardiale Infarktlänge LV}) * 100}{(\text{endokardiale Gesamtlänge LV} + \text{epikardiale Gesamtlänge LV})}$$

Die Wanddicken werden an denselben vier Schnitten im *Scion Image*-Programm ermittelt. Es werden die Dicke des interventrikulären Septums sowie die Dicken der anterioren, der posterioren und der Lateralwand des linken Ventrikels mit dem Cursor ausgemessen.

3.8 Immunhistochemische Analyseverfahren

Für alle immunhistochemischen Färbungen werden die zuvor bei -20 °C gelagerten $10\text{ }\mu\text{m}$ dicken Schnitte im Bereich des Infarktgebietes genutzt.

3.8.1 LacZ-Färbung

Bei der LacZ-Färbung erzeugt die in den KM-Zellkernen der transgenen Mäuse lokalisierte β -Galaktosidase durch den enzymatischen Umsatz eines geeigneten Substrates ein blaues Signal. Die LacZ-Färbung erfolgt vor jeder immunhistochemischen Färbung nach folgendem Protokoll: Zu Beginn werden die Objektträger 3x für jeweils 10 min in PBS gewaschen. Anschließend erfolgt eine zweite Reinigung über 2x 5 min in einer Waschlösung mit folgendem Mischungsverhältnis: 2 ml 1 M MgCl_2 + 10 ml 1 % Na-Desoxycholat + 10 ml 2 % Nonidet P-40 + 1000 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,5, aus 420 ml 0,2 M Na_2HPO_4 + 80 ml 0,2 M NaH_2PO_4 + 1000 ml deionisiertes H_2O). Zuletzt werden die Präparate bei 37 °C über ca. 15 min in die X-Gal-Färbelösung (aus 97 ml Waschlösung + 1 ml 0,25 M $\text{K}_3[\text{Fe}_8\text{Cn}_{96}]$ + 1 ml 0,25 M $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{Cn})_6]$ + 1 ml X-Gal [= 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside]) eingetaucht, wobei das Färbeergebnis direkt unterm Lichtmikroskop betrachtet werden kann. Zur Entfernung der überschüssigen Farbreste werden die Präparate erneut in PBS (2x 5 min) gewaschen, bevor sie immunhistochemisch weiter gefärbt werden können.

3.8.2 Anti-BrdU-Immunfärbung

BrdU ist ein Thymidin-Analogon, welches den Mäusen am fünften und sechsten Behandlungstag intraperitoneal injiziert und während der Zellproliferation in doppelsträngige DNA eingebaut wird [154]. Durch die immunhistochemische Anti-BrdU-Färbung können Zellen identifiziert werden, die die S-Phase durchlaufen haben.

Diese Färbung erfolgt direkt im Anschluss an das LacZ-Färbeverfahren nach den Angaben des Herstellers: Am Anfang werden die Objektträger 15 min in einer zuvor bei -20 °C gelagerten Methanol-Aceton-Mischung (70 % Methanol + 30 % Aceton) nachfixiert. Nach einer Säubereinigung in PBS (2x 5 min) folgt zur Blockung endogener Peroxidasen eine Eintauchung in 3 % H_2O_2 /Methanol über 10 min. Die Präparate werden erneut 2x 5 min in PBS gereinigt und danach 3x 10 min in eine Triton-X-100-Lösung (0,1 %, Verdünnung durch PBS) gegeben. Die Objektträger werden direkt im Anschluss in eine befeuchtete und abgedunkelte Kammer gelegt und 10 min mit 4 N HCl behandelt. Zur Entfernung der restlichen HCL werden die Präparate 3x kurz mit bovinem Serum-Albumin (BSA)/PBS (1 %) gespült, bevor über 30 min eine 100:3-Mischung aus 1 % BSA/PBS und *horse serum* (HS) in einer befeuchteten und abgedunkelten Kammer auf sie einwirken kann. Als nächstes kann der erste Antikörper *BrdU monoclonal antibody from mouse* in einer Verdünnung von 1:500 in 1 % BSA/PBS über 2 h bei Raumtemperatur einwirken.

Nach der zweistündigen Einwirkzeit werden die Objektträger zuerst wieder 3x in PBS gesäubert und erneut mit 1 % BSA/PBS + HS blockiert. Es folgt die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper (*Biotinylated anti-mouse-anti-rabbit*), Verdünnung 1:2000 in 1 % BSA/PBS) über 1 h abgedunkelt bei Raumtemperatur.

Nach erneuter Waschung in PBS (3x 5 min) werden die Objektträger eine halbe Stunde mit *Avidin DH and Biotinylated horseradish peroxidase H reagents* (ABC-Lösung) bedeckt in einer abgedunkelten feuchten Kammer stehen gelassen. Die ABC-Lösung wird mindestens 30 min vor Benutzung hergestellt aus einem Tropfen Lösung A + einem Tropfen Lösung B + 10 ml PBS. Im Anschluss werden die Präparate 3x 5 min in PBS gereinigt und mit einer Mischung aus 0,67 mg/ml *Diaminobenzidine* (DAB) und 0,03 % H_2O_2 /PBS bedeckt. Es erfolgt noch eine letzte Waschung mit PBS, bevor die Schnitte schließlich dehydriert (Ethanol 70 % + Ethanol 96 % + 2x Xylol) und mit Entellan und einem Deckgläschen abgedeckt werden können.

In jedem Färbegang wird zusätzlich ein Darmpräparat einer gesunden Maus (die zuvor BrdU i.p. appliziert bekommen hat) zur Positivkontrolle der Färbung mit behandelt.

3.8.3 Anti-aktivierte Caspase 3-Immunfärbung

Caspase 3 ist eine Effektorcaspase, die im Rahmen der Apoptose aktiviert wird.

Die Reihenfolge der Arbeitsschritte des hierfür verwendeten Protokolls ähnelt vielfach dem zuvor beschriebenen Färbeverfahren (vgl. 3.8.2.): Nach der Fixierung in der oben erwähnten Methanol-Aceton-Mischung werden die Präparate in PBS gewaschen. Es folgt das Eintauchen in die H_2O_2 /Methanol-Lösung (3 %), eine erneute PBS-Waschung und das Einlegen in die Triton-X-100-Lösung (0,1 %). Direkt im Anschluss, nach einer Spülung mit 1 % BSA/PBS, kann die BSA/PBS-HS-Mischung in einer abgedunkelten Kammer einwirken, bevor schließlich der erste Antikörper appliziert wird. Dieser *Anti-ACTIVE*® *Caspase-3*-Antikörper wird den Präparaten in einer Verdünnung von 1:500 (mit 1 % BSA/PBS) zugeführt und wirkt über 2 h in einer feuchten, abgedunkelten Kammer ein. Das weitere Vorgehen erfolgt analog zur BrdU-Färbung. Der zweite Antikörper (*Biotinylated-anti-mouse-anti-rabbit*) wird in einer Verdünnung 1:2000 in PBS für 1 h aufgebracht.

3.9 Auszählung immunhistochemisch markierter Zellen

Die in den immunhistochemischen Färbeverfahren durch die spezifischen Antikörper farblich markierten Zellen werden anschließend mittels eines Durchlichtmikroskops unter einer 400fachen Vergrößerung ausgezählt. Dies erfolgt in der Ebene des Infarktgebietes an mindestens zwei Schnitten pro Herz und Färbeverfahren. Die Markierungen werden getrennt zwischen dem linken Ventrikel und dem Septum interventriculare der Herzen gezählt. Das bläuliche Kernsignal als Ergebnis der LacZ-Färbung wird zur Identifizierung der KM-Kerne verwendet und als numerische Bezugsgröße erfasst.

3.10 Hämatoxylinfärbung

Während die LacZ-Färbung wie beschrieben zur selektiven Markierung der Kardiomyozyten-Kerne verwendet wird, ist es durch die Hämatoxylinfärbung möglich, die Kerne aller Zellen des Herzmuskelgewebes (Kardiomyozyten und Nicht-Muskelzellen) anzufärben. Die Präparate werden im Anschluss an die immunhistochemischen Färbeverfahren und die Analyse der KM mit Hämatoxylin angefärbt: Die Deckgläschen der Objektträger werden in Xylol wieder abgelöst, und die Präparate werden durch eine absteigende Alkoholreihe (2 min 96 % Ethanol – 2 min 70 % Ethanol – 2 min 40 % Ethanol – 2 min PBS) erneut hydriert. Danach folgt das Eintauchen in die Hämatoxylinlösung über ein Zeitraum zwischen 5 und 300 s, abhängig vom lichtmikroskopischen Färbeargebnis. Die restliche Farbe wird unter fließendem Wasser ausgewaschen, die Objektträger werden wieder dehydriert und mit Entellan eingedeckt. Die mit Hämatoxylin angefärbten Zellkerne können erneut mikroskopisch ausgezählt (vgl. 3.9.) und analysiert werden.

3.11 Analyse der mRNA-Expression

Im Herzinfarktmodell werden unterschiedliche Anteile der Mäuseherzen in Flüssigstickstoff bei -80 °C schockgefroren (vgl. 3.5.). Die Bestimmung der mRNA-Expression erfolgt vergleichend am infarzierten und infarktfernen Gebiet der Herzen.

3.11.1 Trizol-Methode zur RNA-Isolation

Die RNA-Isolation der Mäuseherzen erfolgt mittels TRIZOL-Reagenz nach Herstellerangaben basierend auf der Methode von *Chomczynski et al.* [155, 156]: Die bei -80 °C gelagerten Herzanteile werden mit 1-2 ml TRIZOL pro Gewebeprobe homogenisiert. Vor Beginn dieser Homogenisierung und beim Wechsel zu einer anderen Gewebeprobe wird die Homogenisatorspitze intensiv gereinigt und von eventuellen Verunreinigungen befreit. Anschließend wird die Mischung 5 min bei Raumtemperatur (RT) belassen, und es werden 200 µl Chloroform pro ml Trizol zu jedem Röhrchen hinzugefügt. Dieses Gemisch wird 5 min bei RT belassen und anschließend 15 min bei 4 °C und 12000 g zentrifugiert. Im Eppendorf-Röhrchen werden danach drei Schichten sichtbar – in der oberen, wässrigen Phase befindet sich die RNA, in der mittleren Interphase die DNA und in der unteren, rötlich gefärbten, organischen Phase die Proteine. Die klare, obere RNA-Phase wird vorsichtig mit der Pipette aspiriert und in ein neues, sauberes Röhrchen transferiert, zu welchem 500 µl Isopropanol pro ml Trizol hinzugefügt werden. Das Gemisch wird 15 min bei RT stehen gelassen, 15 min mit 12000 g bei 4 °C zentrifugiert, und der Überstand wird entfernt. Die RNA, welche sich als Pellet am Boden des Röhrchens absetzt, kann auf diese Weise von der flüssigen Phase getrennt werden. Es folgt eine Waschung mit 75 % Ethanol/*Diethyl pyro-carbonate*-Wasser (DEPC-H₂O, 1 ml pro ml Trizol) und eine Zentrifugation über 5 min mit 7500 g bei 4 °C. Das RNA-Pellet wird 10 min an der Luft ge-

trocknet, bevor jedem Röhrchen 25 µl DEPC-H₂O zugesetzt werden (Lösungsvorgang bei 60 °C über 10 min). Zuletzt erfolgt die Bestimmung der RNA-Konzentration durch Bestimmung der Lichtextinktion bei 260/280 nm mit dem Photometer, und die Kontrolle der RNA-Integrität erfolgt mittels Gelelektrophorese.

3.11.2 Reverse Transkription und quantitative real time-PCR

Die isolierte mRNA wird durch die reverse Transkription in cDNA umgeschrieben, um anschließend mittels quantitativer real time-PCR (qRT-PCR) quantifiziert werden zu können. Die Verfahren werden in Anlehnung an die Herstellerangaben (*SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for rt-PCR, Invitrogen*) ausgeführt: Die Mischung aus 10 µg der RNA-Proben und 2 µl *Oligo-dT-Primern* (0,5µg/µl) wird bis zu einem Gesamtvolumen von 21 µl pro Röhrchen mit Wasser aufgefüllt. Nach kurzem Zentrifugieren wird das Gemisch 10 min bei 65 °C erwärmt. Anschließend wird ein Reaktionsmix (ohne Reverse Transkriptase [RTase]) dem RNA-Primer-Gemisch hinzugefügt:

Reaktionsmix Reverse Transkription

10x Transkriptionspuffer	4 µl
10 mM dNTP-Mix	4 µl
0,1 M DTT (= Dithiothreitol)	4 µl
RNAseOUT	1 µl
SuperScript II RTase (50 U/µl)	0,5µl

Nach einer vorsichtigen Mischung der Komponenten und einer zweiminütigen Inkubation bei 42 °C wird schließlich die RTase hinzugefügt. Die Röhrchen werden 90 min bei 42 °C belassen und auf ein Gesamtvolumen von 400 µl mit sterilem Zellkulturwasser aufgefüllt.

Die qRT-PCR erfolgt im Anschluss mit folgendem Reaktionsmix und Ablauf im Thermocycler:

Reaktionsmix qRT-PCR

cDNA	10 µl
5x Taq Master	5 µl
10x Taq Puffer	2,5 µl
10 mM dNTPs	0,5 µl
2x Primer (10 µM)	1 µl
SYBR Green (1:1000)	0,5 µl
100x Fluorescein	0,25 µl
H ₂ O	5,15 µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl

Ablauf qRT-PCR

Prädenaturierung	8 min bei 95 °C
-----45 Zyklen-----	
Denaturierung	1 min bei 95 °C
Primerhybridisierung	1 min bei <i>x</i> °C
Elongation	1 min bei 72 °C

	4 min bei 72 °C
	1 min bei 95 °C
80 Zyklen	10 s bei <i>x</i> °C

Folgende Primersequenzen und Hybridisierungstemperaturen (entsprechend x °C im "Ablauf qRT-PCR") werden genutzt (GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase):

GAPDH-Primer	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC	60 °C
	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	
Apaf-1-Primer	TCC TGG TCA TTC GAT GGA AC	57 °C
	TCC AGA TCT TGG CGG TCT TAT C	
Bax-Primer	GGG TGG CAG CTG ACA TGT TTG	57 °C
	TGT CCA GCC CAT GAT GGT TC	
Caspase 6-Primer	GAC TGG CTT GTT CAA AGG AG	57 °C
	CCA GCT TGT CTG TCT GAT GAT C	
Cyclin A-Primer	TGA GAC CCT GCA TTT GGC TGT GAA CT	53 °C
	CCC CCA GAA GTA GCA GAG TTT GTG TA	
Cyclin B2-Primer	AAA GCC GGA GAG GTG GAT GTT G	57 °C
	CAG GAG TCT GCT GCT GGC ATA C	
Cyclin D2-Primer	TGG CCG CAG TCA CCC CTC AC	57 °C
	TCT CTT GCC GCC CGA ATG G	

Das relative Expressionslevel des gesuchten Gens wird aus folgender Formel berechnet:

$$\text{Expressionslevel} = \frac{\text{Kopienanzahl Gen } x \text{ pro } \mu\text{l cDNA} * 1000}{\text{Kopienanzahl GAPDH pro } \mu\text{l cDNA}}$$

3.12 Statistik

Die Messwerte werden in *Microsoft® Excel*-Tabellen erfasst. Die grafische und numerische Analyse der statistischen Daten wird mithilfe von *WinSTAT*, einem Statistik-Add-In für Excel, durchgeführt. Es wird der Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest bei dem Vergleich der ausgezählten immunhistochemisch markierten Zellen und ansonsten, sofern nicht anders angegeben, der t-Test für unverbundene Stichproben zum Vergleich zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe genutzt.

Die in den Tabellen und Abbildungen angegebenen Messergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardfehler (*standard error of the mean = SEM*) beschrieben. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $\leq 5\%$ ($p \leq 0,05$) wird als signifikant, $< 0,1\%$ ($p < 0,001$) als hoch signifikant betrachtet.

3.13 Material

Chemikalien	Hersteller
Aceton	Carl Roth (Karlsruhe)
(<i>ACCUSTAIN™</i>) Bouin's solution	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Agarose	Carl Roth (Karlsruhe)
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-Gal)	AppliChem (Darmstadt)
5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
3,3'-Diaminobenzidine Tablets (DAB)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Diethyl pyro-carbonate (DEPC)	AppliChem (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)
Entellan	Merck (Darmstadt)
Essigsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Forane ®/Forene ® (Isofluran)	Abbott GmbH & Co KG (Lübeck)
Hämatoxylin (<i>ACCUSTAIN™ Hematoxylin solution</i>)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kalium-di-hydrogen-phosphat	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumhexacyanidoferrat(III) ($K_3[Fe(CN)_6]$)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Kaliumhexacyanidoferrat(II) ($K_4[Fe(CN)_6]$)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
Natrium-Desoxycholat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natrium-di-hydrogen-phosphat (NaH_2PO_4)	Merck (Darmstadt)
di-Natrium-hydrogen-phosphat (Na_2HPO_4)	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Carl Roth (Karlsruhe)
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Pifithrin- α	Sigma-Aldrich (Steinheim)
<i>Polyfreeze™ Tissue Freezing Medium™</i>	Polysciences, Inc. (Warrington, USA)
Rimadyl	Pfizer GmbH (Karlsruhe)
Saccharose	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Salzsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Trichlormethan/Chloroform	Carl Roth (Karlsruhe)

Triton X-100	Carl Roth (Karlsruhe)
TRIZOL, Cat. No. 10296-010	Invitrogen (Carlsbad, USA)
<i>Vectabond™ Reagent for Tissue Section Adhesion</i>	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Wasserstoffperoxid 30 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Xylol	Carl Roth (Karlsruhe)

Primärantikörper	Kat. Nr.	Hersteller
<i>Anti-ACTIVE® Caspase-3</i>	G7481	Promega (Madison, USA)
<i>BrdU monoclonal antibody from mouse</i>	M 0744	Dako (Glostrup, DK)
<i>BrdU monoclonal antibody aus Kit</i>	203806	Calbiochem (San Diego, USA)
<i>BrdU Immunhistochemistry System (s.u.)</i>		

Sekundärantikörper	Kat. Nr.	Hersteller
<i>Biotinylated-anti-mouse-anti-rabbit</i>	BA-1400	Vector Laboratories (Burlingame, USA)

Proteine/Enzyme	Hersteller
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Merck (Darmstadt)
DNase I, grade I	Roche Diagnostics (Mannheim)
Proteinase K	Carl Roth (Karlsruhe)

Kits	Kat. Nr.	Hersteller
<i>Accustain™ Trichrome Stain (MASSON)</i>	HT15-1 KT	Sigma-Aldrich (Steinheim)
<i>SuperScript™ First-Strand Synthesis System for rt-PCR</i>	11904-018	Invitrogen (Carlsbad, USA)
<i>VECTASTAIN Elite ABC Kit (Standard)</i>	PK-6100	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
<i>BrdU Immunhistochemistry System</i>	HCS30	Calbiochem (San Diego, USA)

Geräte	Hersteller
Biofuge/pico	Heraeus Instruments (Hanau)
Biofuge/fresco	Heraeus Instruments (Hanau)
Spektrophotometer DU-7500	Beckman Coulter GmbH (Krefeld)
Digitalkamera COOLPIX 4500	Nikon (Japan)
iCycler iQ Real-Time PCR detection system	Bio-Rad (München)
Inkubator	Memmert (Schwabach)
Inkubator	Heraeus Instruments (Hanau)
Leica Bi-Ocular Mikroskop (Leica DM IL)	Leica Microsystems (Heidelberg)
Lichtmikroskop ECLIPSE/E200 POL	Nikon (Japan)
Mikrotom-Kryostat HM 500 OM	Microm Laborgeräte GmbH (Walldorf)
<i>Mouse Ventilator MiniVent, Type 845</i>	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH (March-Hugstetten)
Ultraschallgerät PowerVision, 10 MHz	Toshiba (Neuss)
Software	Hersteller
<i>Adobe Photoshop Version 7.2</i>	Microsoft (Redmont, USA)
<i>Microsoft Office 2007 (Word, Excel, PowerPoint)</i>	Microsoft (Redmont, USA)
<i>Scion Image</i>	Scion Corporation (Frederick, USA)
<i>WinSTAT, Statistik-Add-In für Microsoft Excel</i>	R. Fitch Software (Bad Krozingen)

4 Ergebnisse

4.1 Überlebensanalyse

Die Versuchsmäuse werden nach der chirurgischen LAD-Ligatur über sechs Tage mit PFT- α in zwei verschiedenen Dosen behandelt, um eine mögliche therapeutische Situation i.R. eines MI nachzuahmen. Anhand der Überlebensanalyse sollen die Auswirkungen der PFT- α -Gaben auf die frühe Letalität der Tiere in der ersten Woche nach dem Ereignis betrachtet werden. Die Überlebensanalyse wird mittels der *Kaplan-Meier-Methode* durchgeführt und durch den *Logrank-Test* ausgewertet (Abb. 7.).

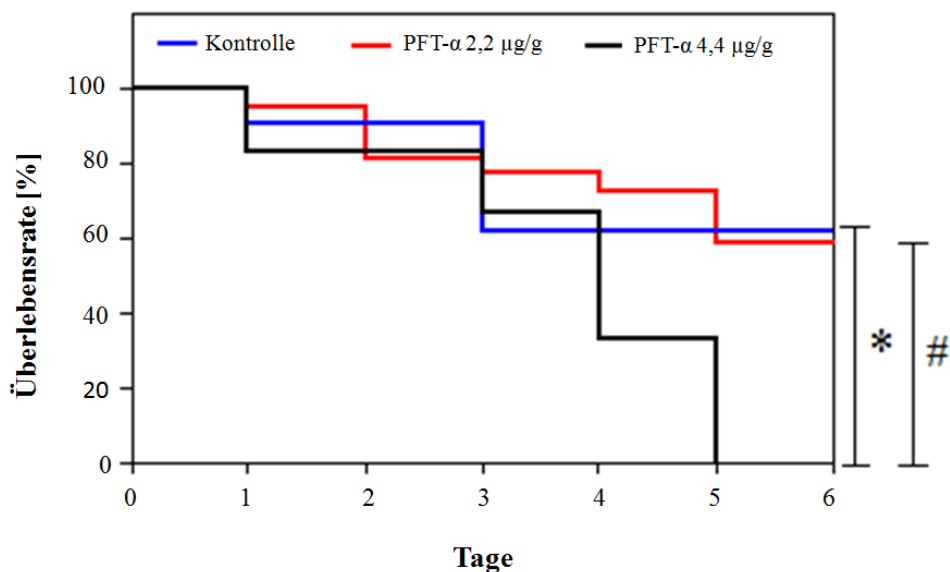


Abb. 7. Überlebensrate der mit PFT- α oder DMSO-behandelten Mäuse 6 Tage nach MI. Kontrolle (blau): 0,22 $\mu\text{l/g KG}$ DMSO, $n = 21$; PFT- α (rot): 2,2 $\mu\text{g/g KG}$, $n = 22$; PFT- α (schwarz): 4,4 $\mu\text{g/g KG}$, $n = 6$; * $p < 0,01$ PFT- α 4,4 $\mu\text{g/g KG}$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ PFT- α 4,4 $\mu\text{g/g KG}$ vs. PFT- α 2,2 $\mu\text{g/g KG}$.

DMSO, Dimethylsulfoxid; KG, Körpergewicht; MI, Myokardinfarkt; PFT- α , Pifithrin- α .

Der Kontrollgruppe werden postoperativ 21 Mäuse zugeordnet, von denen 13 noch sechs Tage später leben (62 %). Es fällt auf, dass sich der vorzeitige Tod aller 8 Kontrolltiere in den ersten drei Tagen nach der LAD-Ligatur ereignete, während ihre Anzahl vom dritten bis zum sechsten Tag konstant bleibt.

22 Mäuse erhalten PFT- α in einer Konzentration von 2,2 $\mu\text{g/g KG}$. Davon überleben 13 Tiere sechs weitere Tage (59 %). Betrachtet man die Überlebenskurve dieser Mäuse, sieht man einen eher gleichmäßigen Verlust über den Beobachtungszeitraum.

Bei den 6 mit einer höheren PFT- α -Dosis (4,4 $\mu\text{g/g KG}$) behandelten Mäusen überlebt dagegen keine den fünften postoperativen Tag. Hier sterben alle Versuchstiere über die sechs Tage verteilt.

Zwischen den Mäusen der Kontrollgruppe und den PFT- α -Mäusen mit niedrigerer Dosis (2,2 $\mu\text{g/g}$ KG) können keine statistisch relevanten Unterschiede bezüglich des postoperativen Überlebens im beobachteten Zeitraum erhoben werden.

Die mit einer höheren PFT- α -Dosis (4,4 $\mu\text{g/g}$ KG) behandelten Tiere zeigen dagegen in den ersten Tagen nach dem Infarktereignis ein signifikant schlechteres Überleben gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,01$) und der mit niedrigerer PFT- α -Dosis behandelten Gruppe ($p < 0,05$).

4.2 Echokardiographie

Zum Vergleich der Herzfunktion sieben Tage nach der LAD-Ligatur werden transthorakale Echokardiographie-Aufnahmen in der parasternalen kurzen Achse durchgeführt. Die Wanddicken an verschiedenen Arealen des linken Ventrikels und geometrische Veränderungen der linken Herzkammer werden erfasst und statistisch verglichen (vgl. Tab. 1.).

Tab. 1. Einfluss von PFT- α auf echokardiographische Parameter 7 Tage nach LAD-Ligatur.

	Kontrolle (DMSO) (n = 6)	PFT-α 2,2 $\mu\text{g/g}$ (n = 7)	p-Wert
LVIDD [mm]	6,0 \pm 0,2	6,1 \pm 0,2	0,73
LVIDS [mm]	5,2 \pm 0,3	5,5 \pm 0,2	0,51
LVAWD [mm]	0,4 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,25
LVAWS [mm]	0,5 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,06
LVPWD [mm]	0,7 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	0,77
LVPWS [mm]	1,2 \pm 0,2	1,1 \pm 0,1	0,39
FS [%]	14 \pm 2	11 \pm 1	0,31
f [min⁻¹]	496 \pm 19	543 \pm 20	0,09
EF [%]	33 \pm 6	28 \pm 3	0,39
FAC [%]	30 \pm 5	20 \pm 3	0,12

DMSO, Dimethylsulfoxid; EF, Ejektionsfraktion; f, Frequenz; FAC, *fractional area change*; FS, Fraktionelle systolische Durchmesserverkürzung; LVAWD/S, linksventrikuläre Vorderwand während Diastole/Systole; LVIDD/S, linksventrikulärer Innendiameter diastolisch/systolisch; LVPWD/S, linksventrikuläre Hinterwand während Diastole/Systole; PFT- α , Pifithrin- α .

In der Kontrollgruppe werden sechs Mäuse echokardiographisch untersucht. Der durchschnittliche Innendurchmesser ihres linken Ventrikels beträgt 6,0 \pm 0,2 mm in der Diastole und 5,2 \pm 0,3 mm in der Systole, hieraus ergibt sich eine fraktionelle systolische Durchmesserverkürzung von 14 \pm 2 %. Bei Betrachtung der Wanddicken des linken Ventrikels zeigt sich die Vorderwand sowohl in der Diastole (0,4 \pm 0,1 mm) als auch in der Systole (0,5 \pm 0,1 mm) dünner als die Hinterwand in der Diastole (0,7 \pm 0,1 mm) bzw. der Systole

($1,2 \pm 0,2$ mm), im Gegensatz zur Hinterwand fällt zudem eine fehlende systolische Dickenzunahme der Vorderwand auf.

Die diastolischen und systolischen Diameter und Wanddicken der PFT- α -Gruppe verhalten sich ähnlich zueinander. Auch die Vorderwand der PFT- α -Mäuse ist in der Diastole und Systole durchschnittlich dünner als die Hinterwand, und auch hier ist die fehlende systolische Dickenzunahme der Vorderwand nachzuweisen.

Beim Vergleich beider Gruppen können keine signifikanten Unterschiede bezüglich der echokardiographisch gemessenen Parameter ermittelt werden. Die Werte zeigen in beiden Gruppen lediglich einen Trend der Ausdünnung der primär vom Infarkt betroffenen Vorderwand im Vergleich zur Hinterwand. Außerdem kann im systolischen Zustand eine Tendenz zur vermehrten Ausdünnung der Vorderwand unter Pifithrin- α festgestellt werden ($p = 0,06$ für PFT- α vs. DMSO-Kontrolle).

Neben der Erfassung der strukturellen Ventrikelveränderungen werden in der M- und B-Mode-Einstellung verschiedene Herzfunktionsparameter ermittelt. Dazu erfolgt die Messung der Herzfrequenz und die Berechnung von EF und FAC.

Die Herzfrequenz der Kontrolltiere beträgt $496 \pm 19 \text{ min}^{-1}$, ihre Ejektionsfraktion liegt bei $33 \pm 6 \%$ und die FAC bei $30 \pm 5 \%$.

Die Mäuse der PFT- α -Gruppe zeigen etwas höhere Herzfrequenzraten ($543 \pm 20 \text{ min}^{-1}$), während die Berechnungen der zwei weiteren Funktionsparameter niedrigere Mittelwerte ergeben.

Im statistischen Vergleich ergibt sich ein Trend der Frequenzzunahme unter der PFT- α -Behandlung ($p = 0,09$), wohingegen die Parameter der systolischen Funktion des LV in der PFT- α -Behandlungsgruppe tendenziell abnehmen (FAC: $p = 0,12$; EF: $p = 0,39$; FS: $p = 0,31$).

Insgesamt zeigt die echokardiographische Untersuchung eine Dilatation und eine globale Einschränkung der systolischen Funktion des linken Ventrikels, insbesondere die Vorderwand des LV zeigt (erwartungsgemäß) durch den LAD-Verschluss die stärksten Veränderungen im Sinne einer Ausdünnung und fehlenden Kontraktilität; diese Effekte sind unter PFT- α tendenziell noch stärker ausgeprägt.

4.3 Organisolation

Am siebten Tag nach der LAD-Ligatur werden Herz, Lunge und Leber der getöteten Mäuse isoliert, auch der Thorax der vorzeitig verstorbenen Tiere wird eröffnet. Dabei können sowohl in der Kontroll- als auch in den mit PFT- α behandelten Gruppen große Blutkoagel in der Thoraxhöhle beobachtet werden, die auf Herzrupturen als Todesursache hindeuten. Diese werden ausschließlich bei den in der ersten Woche vorzeitig versterbenden Mäusen gefunden und nicht bei den geplant am siebten Tag getöteten. Dieser Befund der Herzruptur findet sich auch bei allen Mäusen, die eine hohe PFT- α -Dosis ($4,4 \mu\text{g/g}$) erhalten haben und vorzeitig versterben.

4.4 Morphometrie

Um die Mäuse der verschiedenen Untersuchungsgruppen morphometrisch vergleichen zu können, werden die Körpergewichte der Tiere präoperativ und am siebten postoperativen Tag gemessen. Nachdem die Organe isoliert sind, folgen außerdem die Gewichtsmessungen von Lunge, Leber und Herz (RV, LV mit/ohne Infarkt), und die Erfassung der Tibiallänge. Die Mittelwerte und SEM der erhobenen Daten werden in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2. Körper- und Organgewichte der Mäuse präoperativ und am 7. postoperativen Tag nach LAD-Verschluss.

Parameter	Kontrolle (DMSO)	PFT- α 2,2 μ g/g	p-Wert
KG, Tag 0 [g]	41 \pm 1 (n = 18)	42 \pm 1 (n = 22)	0,49
KG, Tag 7 [g]	37 \pm 2 (n = 8)	38 \pm 1 (n = 13)	0,61
Herz, rel. Gewicht, Tag 7 [mg/g]	7,4 \pm 0,6 (n = 8)	7,7 \pm 0,4 (n = 13)	0,65
RV, rel. Gewicht, Tag 7 [mg/g]	1,3 \pm 0,1 (n = 5)	1,2 \pm 0,1 (n = 5)	0,33
LV, Infarktgebiet, rel. Gewicht, Tag 7 [mg/g]	1,9 \pm 0,4 (n = 5)	2,1 \pm 0,3 (n = 5)	0,73
LV, ohne Infarkt, rel. Gewicht, Tag 7 [mg/g]	3,1 \pm 0,3 (n = 5)	3,1 \pm 0,3 (n = 5)	1,0

DMSO, Dimethylsulfoxid; KG, Körpergewicht; LV, linker Ventrikel; PFT- α , Pifithrin- α ; rel., relativ (Organgewicht bezogen aufs Körpergewicht der Tiere); RV, rechter Ventrikel.

Bei den überlebenden Mäusen werden Herz, Lunge und Leber gewogen. Eine weitere Zerlegung der Herzen (in RV, LV mit/ohne Infarkt) erfolgt nur bei den für die molekularbiologischen Untersuchungen benötigten Tieren (n = 5 in beiden Gruppen), während die histologisch weiter verwerteten Herzen intakt bleiben müssen.

Ausgehend von einem Ausgangsgewicht von 41 \pm 1 g, nehmen die Kontrollmäuse im Beobachtungszeitraum nach LAD-Verschluss durchschnittlich 4,0 \pm 0,5 g ab. Am siebten Tag nach LAD-Ligatur haben sie ein relatives Herzgewicht von 7,4 \pm 0,6 mg/g. Betrachtet man die Herzkammern genauer, macht das Infarktgebiet einen Anteil von 1,9 \pm 0,4 mg/g aus. 3,1 \pm 0,3 mg/g des linken Ventrikels und der gesamte rechte Ventrikel (1,3 \pm 0,1 mg/g) sind dagegen nicht infarziert.

Das mittlere Ausgangsgewicht der PFT- α -Mäuse liegt bei 42 \pm 1 g und sie haben am siebten postoperativen Tag ein vergleichbares relatives Herzgewicht von 7,7 \pm 0,4 g. Die anderen morphometrischen Parameter zeigen ebenso keine deutlichen Abweichungen gegenüber der Kontrollgruppe.

Insgesamt können sowohl bei den Körper- als auch Organgewichten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen ermittelt werden.

4.5 Histologische Bestimmung der Infarktgrößen

Zur Bestimmung der Infarktgröße werden in jedem Herz vier Schnitte, die in den gleichen Ebenen (Positionen 1-4, vgl. Abb. 6.) zwischen Herzspitze und –basis lokalisiert sind, angefärbt und ausgewertet (Abb. 8.).

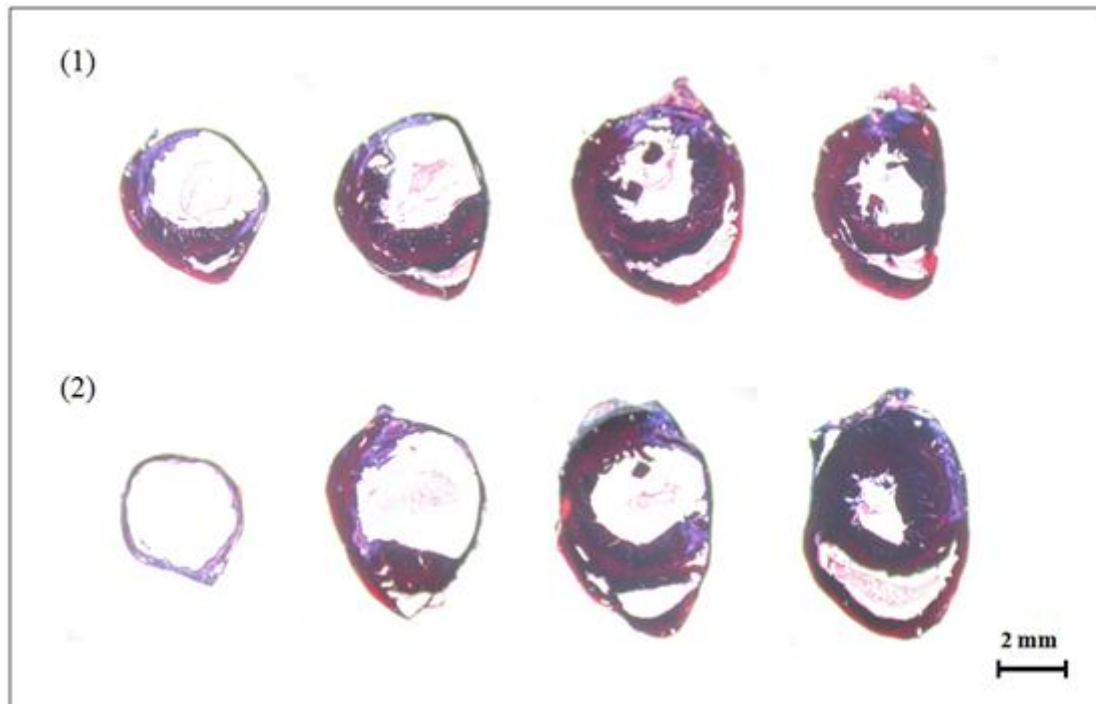


Abb. 8. Analyse der Infarktausdehnung 7 Tage nach LAD-Verschluss zwischen Herzspitze und –basis im Herzquerschnitt (Positionen 1 bis 4 von links nach rechts).

Durch die Trichrome-Färbung stellt sich die intakte Herzmuskulatur rot-violett dar, und fibröses Bindegewebe (Infarktgebiet) färbt sich bläulich-violett an. **(1)** Kontrolle (DMSO-Behandlung), Infarktgröße 39 %, **(2)** PFT- α Behandlung (2,2 $\mu\text{g/g}$), Infarktgröße: 54 %. DMSO, Dimethylsulfoxid; PFT- α , Pifithrin- α .

Das basisnahe Gebiet der Kontrollgruppe ist kaum infarziert und ermöglicht eine Beschreibung der Verhältnisse im gesunden Herzen (Abb. 8. (1) rechts): Im oberen Bildanteil sieht man den linken Ventrikel. Er besitzt eine annähernd gleichmäßige, runde Form, ein großes Lumen und zeichnet sich durch eine muskelstarke Wand aus. Im Inneren des LV befinden sich Anschnitte der Papillarmuskeln, welche kegelförmig in das Lumen hineinragen und mit ihren Sehnenfäden zu den atrioventrikulären Klappen ziehen. Der rechte Ventrikel dagegen (unterer Bildanteil) hat ein deutlich geringeres Lumen und eine dünnere, muskelschwächere Wand als der linke.

Zur Herzspitze hin nimmt die Infarktausdehnung (entsprechend dem Versorgungsgebiet der LAD) kontinuierlich zu. Im Apex-nahen Schnitt der PFT- α -Gruppe ist es nicht mehr möglich, muskuläre Herzstrukturen zu differenzieren, da sich das Infarktgebiet über die gesamte Wand des linken Ventrikels bis in das Septum interventriculare hineinzieht.

Die transmuralen Infarkte führen zu einer starken Ausdünnung der LV-Wand und zu einer Vergrößerung des Lumens der linken Herzkammer, und es kommt zu deutlichen Veränderungen der gesamten Ventrikelform.

In den basisnahen Schnitten (Abb. 8. (2) rechts) des Herzes der mit PFT- α behandelten Maus (2,2 $\mu\text{g/g}$) lässt sich erkennen, dass auch die Papillarmuskulatur mit vom Infarkt betroffen ist. Es fällt außerdem eine Lumeneinengung des LV im Basis-nahen Schnitt bei einer gleichzeitig bestehenden Hypertrophie der nicht-infarzierten Wandsegmente auf (Abb. 8. (2) rechts).

In beiden Herzen können transmurale Infarkte beobachtet werden, deren Ausmaß im Verlauf von der Herzbasis hin zum Apex kontinuierlich zunimmt. Das Infarktgebiet erstreckt sich insbesondere über die freie Vorder- und Lateralwand des linken Ventrikels, dehnt sich aber in apexnahen Schnitten bis in die Hinterwand und das Septum interventriculare aus.

Im abgebildeten Beispiel zeigt das Herz der PFT- α -Gruppe gegenüber dem Beispiel der Kontrollgruppe eine größere Infarktausdehnung.

Um die Unterschiede der Infarktausdehnung zwischen den Gruppen quantifizieren zu können, wird die Infarktausdehnung nach der oben genannten Formel (vgl. 3.7., Abb. 9.) berechnet.

Die mittlere Infarktgröße der Kontrollgruppe beträgt $51 \pm 8 \%$. Dagegen ist die mittlere Infarktgröße der PFT- α -Gruppe mit $62 \pm 7 \%$ signifikant größer ($p < 0,05$ vs. Kontrolle).

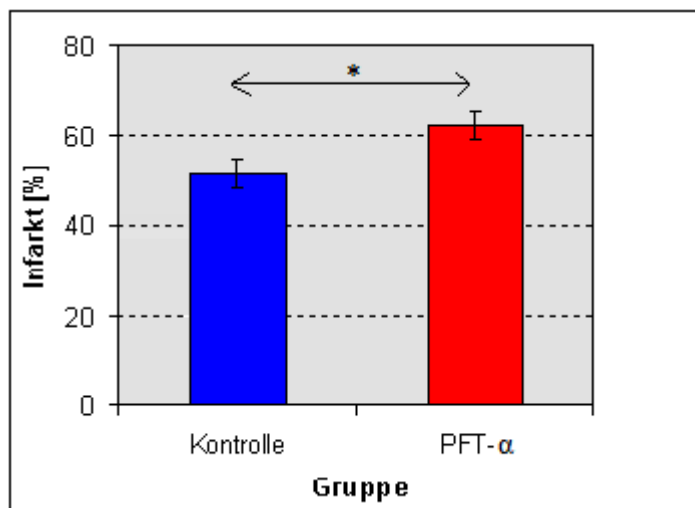


Abb. 9. Infarktgrößen im Vergleich zwischen Kontroll (n = 8; $51 \pm 8 \%$)- und PFT- α (2,2 $\mu\text{g/g}$, n = 9, $62 \pm 7 \%$)-Gruppe. * $p < 0,05$ PFT- α vs. Kontrolle. PFT- α , Pifithrin- α .

4.6 Wanddicken

Die echokardiographisch und mikroskopisch dünner erscheinenden Ventrikelwände der mit PFT- α behandelten Tiere werden mittels Computeranalysen quantifiziert. Dazu werden in beiden Untersuchungsgruppen Mittelwerte der Dicken des interventrikulären Septums, der Lateral-, der Vorder- und der Hinterwand in den verschiedenen Schnittebenen (Positionen 1-4, vgl. 3.7.) zwischen Apex und Basis bestimmt (Abb. 10.).

Betrachtet man die Situation der Kontrollgruppe ist eine Zunahme der Dicke in der Vorder-, Lateral- und Hinterwand im Verlauf von Position 1 zu Position 4 erkennbar. Während 7 Tage nach LAD-Verschluss die Vorderwand apikal (Position 1) durchschnittlich nur $0,3 \pm 0,1$ mm dick ist, beträgt die Vorderwand-Dicke in Basisnähe (Position 4) $1,3 \pm 0,2$ mm. Die Lateralwand nimmt von $0,4 \pm 0,1$ mm (Position 1) auf $1,2 \pm 0,1$ mm (Position 4) zu, und auch die Hinterwand ist in Apexnähe deutlich ausgedünnter (Position 1: $0,5 \pm 0,1$ mm) als basal (Position 4: $1,7 \pm 0,2$ mm). Lediglich die Dicke des interventrikulären Septums bleibt in den Schnittebenen 1-4 annähernd konstant (Position 1: $0,9 \pm 0,2$ mm, Position 4: $1,2 \pm 0,1$ mm).

Analog sind auch bei den mit PFT- α behandelten Herzen alle Wände des linken Ventrikels apikal dünner als basal. Eine Infarzierung der Hinterwand im Sinne einer möglichen Infarktprogression kann ebenso wie in der Kontrollgruppe beobachtet werden (Hinterwand Position 1: $0,4 \pm 0,1$ mm; Position 4: $1,5 \pm 0,2$ mm). Außerdem nimmt die Dicke des interventrikulären Septums auch unter PFT- α nur in der apikal gelegenen Schnittebene (Position 1) ab.

Insgesamt können im Vergleich zwischen der Kontroll- und der PFT- α -Gruppe keine signifikanten Unterschiede der Wanddicken in den verschieden lokalisierten Ebenen ermittelt werden. Die Ergebnisse spiegeln in beiden Gruppen ein v.a. apikal und in der Vorderwand lokalisiertes Infarktgebiet wider, dass sich nach basal und auch in die Lateral- und Hinterwand des rechten Ventrikels ausbreitet. Das Septum interventriculare ist dabei nur im Bereich der Herzspitze direkt vom Infarkt betroffen und ist weiter basal, insbesondere in den Positionen 2 und 3, dicker als die restlichen Wände des LV.

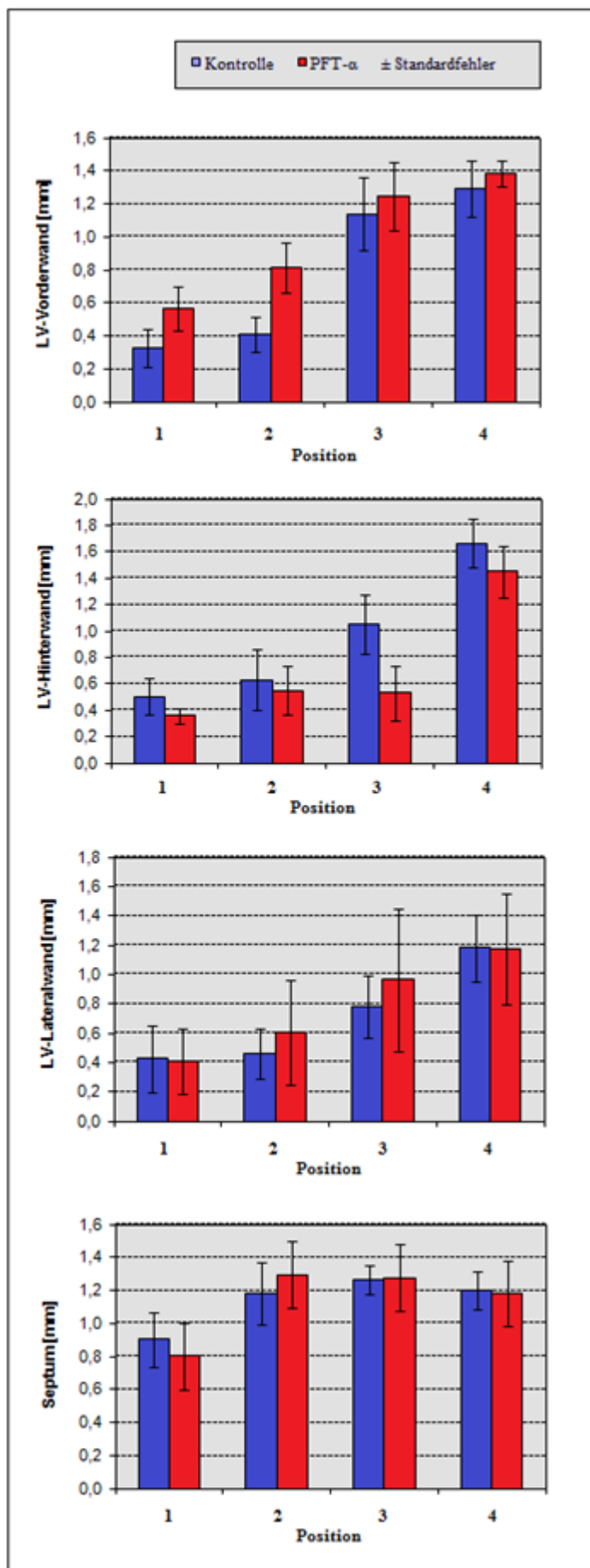


Abb. 10. Wanddicken von Vorder-, Lateral- und Hinterwand des LV und vom Septum interventriculare im Vergleich zwischen Kontroll- (n=5) und PFT- α - (2,2 μ g/g, n=7) Gruppe. In jedem Herz wurden vier Schnitte in ihrem Verlauf vom Apex (Position 1) zur Herzbasis (Position 4) untersucht. LV, Linker Ventrikel; PFT- α , Pifithrin- α .

4.7 Effekte von PFT- α auf die Apoptose von Kardiomyozyten

Wie zuvor beschrieben lässt sich nach Gabe von PFT- α eine größere Infarktausdehnung beobachten als dies bei den Tieren der Kontrollgruppe der Fall ist. Auf der Suche nach molekularen Mechanismen, die bei dieser Infarktexpansion eine Rolle spielen könnten, wird das Vorkommen apoptotischer KM in Randbereichen des Infarktareals (*adjacent*) und im infarktfernen Myokard (*remote*) untersucht. Apoptotische Herzmuskelzellen werden dabei durch die Anti-aktivierte-Caspase 3-Immunfärbung markiert (Abb. 11.) und im Verhältnis zur Gesamtzahl aller KM getrennt für die beiden Regionen (*adjacent*: LV; *remote*: Septum interventriculare) gezählt (Tab. 3.).

Tab. 3. Anzahl Caspase 3 (aktiviert)-positiver Kardiomyozyten 7 Tage nach LAD-Ligatur im Vergleich zwischen Kontroll- und PFT- α (2,2 μ g/g)- Gruppe.

	LV	Septum	Gesamt
Kontrolle (n = 8)	16/32831 (0,05 %) *†	8/65454 (0,01 %)	24/98285 (0,02 %) §
PFT-α (n = 10)	8/40904 (0,02 %) #	5/83326 (0,01 %)	13/124230 (0,01 %)

* $p < 0,001$ vs. Septum, † $p < 0,05$ vs. PFT- α (LV), # $p < 0,05$ vs. Septum, § $p < 0,01$ vs. PFT- α . LV, linker Ventrikel (Randbereich des Infarktes); PFT- α , Pifithrin- α ; Septum, Septum interventriculare.

In der Kontrollgruppe sind von insgesamt 98285 Kardiomyozyten 24 positiv für aktivierte Caspase 3 (0,02 %). Der größte Anteil dieser Zellen (16 von 32 831) befindet sich im Grenzgebiete des Myokardinfarktes (freie Wand des LV). Damit ist in den Kontrollherzen der Anteil an apoptotischen KM im infarktnahen Myokard des LV hoch signifikant ($p < 0,001$) gegenüber dem infarktfernen Septum interventriculare vermehrt.

In der PFT- α -Gruppe werden insgesamt 124 230 Herzmuskelzellen gezählt, von denen 13 positiv für aktivierte Caspase 3 sind. Auch hier zeigen sich im infarktnahen LV signifikant mehr apoptotische KM als im interventrikulären Septum ($p < 0,05$).

Vergleicht man die beiden Behandlungsgruppen miteinander, kann sowohl im Grenzbereich des Infarktes als auch bei der Betrachtung des gesamten Herzens eine signifikant höhere Anzahl apoptotischer KM in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (LV: $p < 0,05$, gesamt: $p < 0,01$ vs. PFT- α). Ein qualitativ ähnlicher Effekt wird auch bei Betrachtung des infarktfernen Myokards sichtbar ($p = 0,16$).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es nach LAD-Ligatur im Grenzbereich des Infarktes (LV) im Vergleich zu weiter entfernt gelegen Herzanteilen (Septum interventriculare) zu einer gesteigerten Apoptose kommt. Dies wird sowohl in der Kontroll- als auch in der Behandlungsgruppe beobachtet. Unter dem Einfluss von PFT- α können jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant geringere Apoptoseraten gemessen werden.

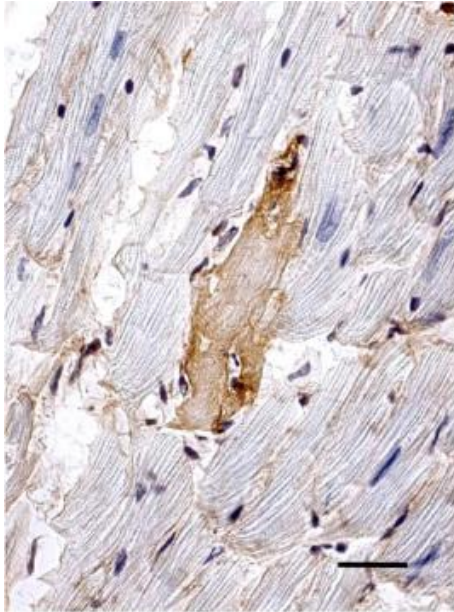


Abb. 11. Beispiel für einen apoptotischen KM (braune Farbe des Zytoplasmas) der PFT- α -Gruppe nach Anfärbung durch die Anti-aktivierte Caspase 3-Immunfärbung. Im Anschnitt sind zudem KM-Zellkerne (länglich, blau-violett, LacZ-Kernfärbung) und die gestreifte Herzmuskulatur erkennbar.

KM, Kardiomyozyt(en). Balken: 20 μ m.

4.8 Effekte von PFT- α auf die Zellzyklusaktivität von Kardiomyozyten

Wie eingangs ausgeführt spielt p53 nicht nur eine Rolle bei der Regulation der Apoptose, sondern greift auch hemmend in die Regulation des Zellzyklus ein. Um den Einfluss des p53-Inhibitors PFT- α auf die Zellzyklusaktivität von Kardiomyozyten zu untersuchen, wird die Anti-BrdU-Immunfärbung (vgl. 3.8.2.) genutzt. Die Ergebnisse der Färbung sind getrennt für den infarkt-nahen (LV) und -fernen (Septum interventriculare) Bereich des linken Ventrikels 7 Tage nach LAD-Verschluss in Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4. Anzahl BrdU-positiver Kardiomyozyten 7 Tage nach LAD-Ligatur im Vergleich zwischen Kontroll- und PFT- α (2,2 μ g/g)-Gruppe.

	LV	Septum	Gesamt
Kontrolle (n = 7)	9/30061 (0,03 %)	3/31984 (0,01 %)	12/62045 (0,02 %)
PFT-α (n = 7)	3/19923 (0,02 %)	2/29795 (0,01 %)	5/48701 (0,01 %)

KM, Kardiomyozyten; LV, linker Ventrikel (Randbereich des Infarktes); Septum, Septum interventriculare.

In der Kontrollgruppe werden insgesamt 62 045 Herzmuskelzellen ausgewertet, unter denen sich 12 BrdU-positive befinden (0,02 %). Vergleicht man die ermittelten Werte im linken Ven-

trikel mit denen des interventrikulären Septums zeigt sich ein tendenziell höherer Anteil BrdU-positiver Kardiomyozyten im Grenzbereich des Infarktes der linken Herzkammer ($p = 0,06$).

Die Analysen belegen, dass PFT- α die S-Phase-Aktivität der Kardiomyozyten nicht nennenswert beeinflusst. Bei den mit Pifithrin- α behandelten Mäusen zeigen von 48701 analysierten Kardiomyozyten nur 5 BrdU-Positivität (0,01 %), zwischen LV und dem Septum interventriculare lässt sich kein relevanter Unterschied detektieren. Der Vergleich der Anzahl BrdU-positiver KM zwischen Kontroll- und PFT- α -Gruppe ergibt keine statistisch signifikanten Unterschiede.

4.9 Zelluläre Zusammensetzung der Infarktnarbe

Als weiterer Aspekt soll analysiert werden, ob PFT- α Einfluss auf die Ausbildung der Infarktnarbe nimmt und somit eine Ursache für die Infarktexpansion bzw. das vermehrte Auftreten von Ventrikeldrupturen nachgewiesen werden kann. Neben den Kardiomyozyten spielen in der Infarktnarbe andere Zellarten, vor allem Bindegewebszellen, eine entscheidende Rolle.

Die Hämatoxylin-Färbung ermöglicht die Anfärbung von Zellkernen aller Zellarten in einem blau-violetten Ton. Daher kann durch eine Kombination mit den immunhistochemischen Färbeverfahren die Replikations- bzw. Apoptosehäufigkeit der Zellen der Infarktnarbe bestimmt werden (Tab. 5.).

Tab. 5. Bestimmung der Zellularität sowie der S-Phase-Aktivität (BrdU) und der Apoptosehäufigkeit (aktivierte Caspase 3) in der Infarktnarbe 7 Tage nach LAD-Ligatur im Vergleich zwischen Kontroll- und PFT- α (2,2 $\mu\text{g/g}$)-Gruppe.

	Zellen gesamt in Narbe* ¹	BrdU-positiv gesamt* ²	Caspase 3-positiv gesamt* ²
Kontrolle (n = 8)	837 \pm 59 #	2081/11458 (18 %) †	3/6699 (0,04 %)
PFT-α (n = 9)	637 \pm 62	1227/10469 (12 %)	3/5041 (0,06 %)

*¹ pro mikroskopischem Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung, *² insgesamt ausgezählte Zellen; # $p < 0,05$ vs. PFT- α . † $p < 0,001$ vs. PFT- α . BrdU, 5-Bromo-2'-deoxyuridine; PFT- α , Pifithrin- α .

In der Kontrollgruppe können pro mikroskopischem Gesichtsfeld bei einer 400fachen Vergrößerung 837 \pm 59 Zellen ausgezählt werden. Von insgesamt 11 458 gezählten Zellen zeigen sich 2081 (18 %) BrdU-positiv und 3 von 6699 (0,04 %) exprimieren aktivierte Caspase.

Mit 637 \pm 62 Zellen pro mikroskopischen Gesichtsfeld gibt es signifikant weniger Zellen in der Infarktnarbe der mit PFT- α behandelten Gruppe ($p < 0,05$), auch der Anteil BrdU-positiver Zellen ist hoch signifikant geringer (12 %, $p < 0,001$). Der Anteil apoptotischer Zellen ist dagegen mit 3 von 5041 (0,06 %) nicht relevant verändert.

Im Gegensatz zur Apoptosehemmung bei den Kardiomyozyten kommt es somit im Bereich der bindegewebigen Narbe nicht zu einer Beeinflussung der Apoptose unter Pifithrin- α .

4.10 Analyse der mRNA-Expression von Zellzyklus- und Apoptose-assoziierten Genen

Mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR) soll die mRNA-Expression verschiedener Zellzyklus- und Apoptose-assoziiierter Gene nach MI im infarzierten und infarktfernen Myokard (Septum interventriculare) bestimmt und der Einfluss von PFT- α (2,2 $\mu\text{g/g}$) hierauf untersucht werden. Im Einzelnen wird die Expression der Cycline A, B2 und D2 als Zellzyklus-typische Marker und die Expression von Apaf-1, Bax und Caspase 6 als Apoptose-assoziierte Gene untersucht (Abb. 12.).

Im Infarktgebiet der Kontrollherzen werden auf 1000 Kopien GAPDH durchschnittlich 709 ± 229 Kopien Cyclin A exprimiert, $0,6 \pm 0,3$ Kopien Cyclin B2 und $1,8 \pm 0,4$ Kopien Cyclin D2. Diese Werte sind für alle drei Zellzyklus-assoziierten-Gene signifikant größer als die im nicht-infarzierten Gebiet gemessenen Vergleichswerte (jeweils $p < 0,05$).

Auch unter PFT- α können signifikant höhere Expressionslevel der Cycline im Infarktgebiet als im infarktfernen Myokard beobachtet werden (jeweils $p < 0,05$). Es werden in den infarzierten Regionen des LV 357 ± 26 Kopien Cyclin A, $0,5 \pm 0,2$ Kopien Cyclin B2 und $1,3 \pm 0,2$ Kopien Cyclin D2 auf 1000 Kopien GAPDH gemessen.

Vergleicht man die Werte zwischen den beiden Untersuchungsgruppen sprechen die Zahlen für eine tendenzielle Abnahme der Cyclin-Expressionslevel im Infarktgebiet unter der Behandlung mit Pifithrin- α . Dies spiegelt allerdings nur einen Trend wider, da für keines der Cycline ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden kann.

Im Infarktgebiet der Kontrollgruppe können auf 1000 Kopien GAPDH $11 \pm 3,8$ Kopien Bax und $0,5 \pm 0,2$ Kopien Caspase 6 gemessen werden. Dabei handelt es sich um Werte, die im Infarktgebiet tendenziell größer sind als im nicht-infarzierten Bereich (für beide $p = 0,08$).

Apaf-1 zeigt dagegen insgesamt nur extrem geringe Expressionslevel ($< 0,01$ Kopien pro 1000 Kopien GAPDH), hier können keine Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Herzregionen beobachtet werden.

Unter der PFT- α -Behandlung zeigen sich analog zur Kontrollgruppe tendenziell höhere Expressionslevel der Apoptosegene im Infarktgebiet. Während bei Bax hier ein starker Trend zur höheren Expression besteht ($p = 0,05$), sind die Werte unter Caspase 6 sogar signifikant gesteigert ($p < 0,05$). Apaf-1 wird dagegen auch unter PFT- α -Einfluss nur sehr gering exprimiert.

Beim Vergleich der Expression der Apoptosegene zwischen der Kontroll- und Behandlungsgruppe zeigten sich allerdings keine signifikanten Unterschiede.

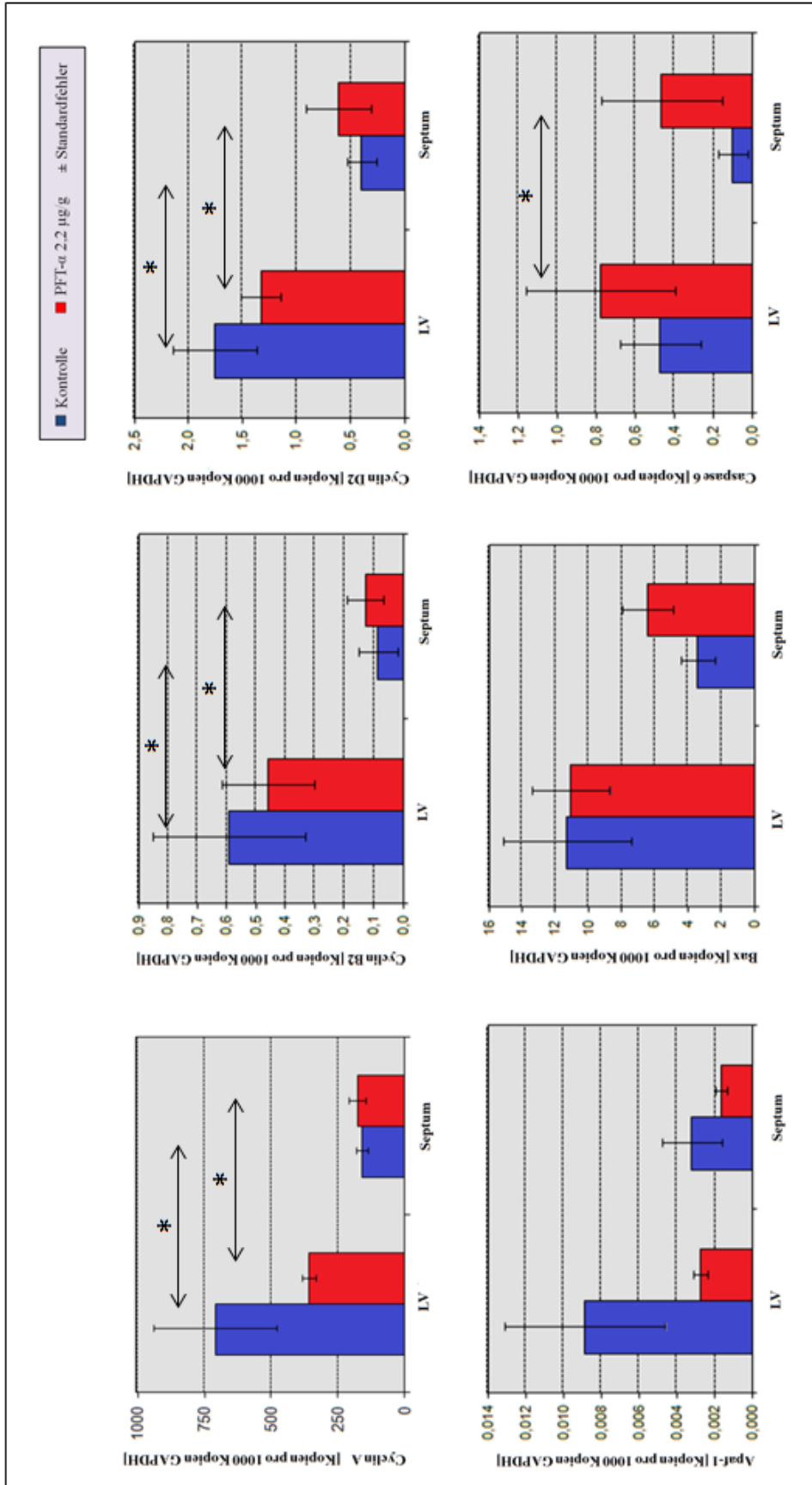


Abb. 12. mRNA-Expressionslevel verschiedener Zellzyklus- und Apoptose-assoziiierter Gene im Vergleich zwischen Kontroll- (n=8) und PFT-α- (2,2 µg/g, n=8) Gruppe. * p<0,05. GAPDH, Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; LV, Linker Ventrikel; PFT-α, Pifithrin-α; Septum, Septum interventriculare.

5 Diskussion

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache in Deutschland dar, insbesondere der Myokardinfarkt hat oft schwerwiegende Folgen und Komplikationen [1, 2]. So kommt es bei Patienten, die einen akuten Myokardinfarkt überleben, häufig zu komplexen Veränderungen der ventrikulären Architektur, dem **kardialen Remodeling**, welches zumeist in einer progressiven Herzinsuffizienz endet und die Prognose der betroffenen Patienten stark verschlechtert [23].

Über viele Jahre haben sich medikamentöse und interventionelle Therapien etabliert, die zu einem Rückgang der Herzinfarkt-Letalität geführt haben [4, 6]. Mit einem zunehmenden Verständnis der molekularen Mechanismen des Myokardinfarkts, eröffnen sich auch viele (hypothetische) neue Therapieansätze, die die Todes- und Komplikationsraten weiter senken könnten. Beim Untergang der Kardiomyozyten spielt neben der Nekrose auch die **Apoptose** eine wichtige Rolle [52], wobei das Kernprotein **p53** als ein zentraler Regulator dieser Art des programmierten Zelltods gilt [94, 95]. Es kann theoretisch auf verschiedenen Wegen inhibiert werden, um die Anzahl der zugrunde gehenden Herzmuskelzellen nach einer Herzschädigung zu verringern. Bereits zuvor konnte gezeigt werden, dass der p53-Hemmer **PFT- α** nach einer Herzschädigung durch Zytostatika, UV- oder γ -Bestrahlung protektiv auf das Myokard wirkte, was auf eine Apoptosehemmung zurückgeführt werden konnte [130].

Neben seinen Funktionen bei der Apoptose, kann p53 auch einen reversiblen oder irreversiblen **Zellzyklusarrest** vermitteln, wobei die genaue Wirkungsweise hier noch nicht eindeutig geklärt ist [100]. Dies ist insofern auch für denkbare therapeutische Interventionen interessant, da nach dem Verlust von Herzmuskelgewebe über eine Reaktivierung der Zellteilung von bereits differenzierten Kardiomyozyten durch Induktion des Wiedereintritts der Zellen in den Zellzyklus evtl. Regenerationsvorgänge ausgelöst bzw. unterstützt werden könnten [107].

In dieser Arbeit sollten die Effekte von Pifithrin- α bei einer transienten Applikation über sechs Tage nach einem Herzinfarkt untersucht werden, insbesondere der Einfluss der Substanz auf den Zellzyklus und die Apoptose.

Zur Erzeugung eines Myokardinfarkts wurde an Mäuseherzen nach der Öffnung des Thorax eine **LAD-Ligatur** durchgeführt. Es handelt sich um ein etabliertes Verfahren, das bereits zuvor in zahlreichen Studien verwendet [76, 157] und als geeignetes Tiermodell des Herzinfarkts beschrieben worden ist [158].

Schon intraoperativ konnten die Folgen der Koronar-Ligatur beobachtet werden: die apikale, anteriore Ventrikelwand verblasste und die Kontraktilität nahm an dieser Stelle ab. In Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Studien [3, 159] führte die LAD-Ligatur der Mäuseherzen zu einem Vorderwandinfarkt und die ischämische Läsion war hauptsächlich apikal lokalisiert.

Nach dem Infarkt wurden die Tiere zufällig auf die Kontrollgruppe und zwei PFT- α -Gruppen verteilt, welche sich durch ihre jeweilige **Dosis** unterschieden. Ein Anteil der Tiere erhielt eine Dosis von 2,2 $\mu\text{g/g}$ KG, und ein anderer eine doppelt so hohe Dosis (4,4 $\mu\text{g/g}$ KG). Während die Mäuse täglich die PFT- α - bzw. DMSO-Dosis (Kontrollgruppe) appliziert bekamen, wurde ihr Zustand in der ersten postoperativen Woche beobachtet. Dabei war auffällig, dass bei einer Dosis von 4,4 $\mu\text{g/g}$ keine Maus sechs Tage nach dem Infarkt überlebte, während die Dosis von 2,2 $\mu\text{g/g}$ das Überleben der Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht nennenswert beeinflusste. Dieses Ergebnis war überraschend, da bisher keine Studien existieren, unter denen es zu einer **gesteigerten Letalität** nach PFT- α -Applikation bei einer Herzschädigung gekommen ist. Vielmehr wurden bisher zumeist kardioprotektive Effekte durch die Gabe dieses p53-Hemmers beschrieben [144, 160, 161].

Es ist bekannt, dass die Anwendbarkeit von PFT- α auf ein umschriebenes therapeutisches Fenster begrenzt ist [131]. Schon bei mittleren Dosierungen von 21,3 $\mu\text{mol/l}$ kam es zu einer zytotoxischen Wirkung auf Zellkulturen, und bei Dosierungen $> 30 \mu\text{mol/l}$ kam es zur Auskristallisation der Substanz [131]. In ähnlichen Studien am Herzen wurde sowohl die höhere als auch die niedrigere PFT- α -Dosis nach Herzschädigung verwendet [130, 143-145], und unter beiden konnten kardioprotektive beobachtet werden. Dabei führte die Gabe von 4,4 $\mu\text{g/g}$ Pifithrin- α im Mausmodell mit Zytostatika-induzierter Kardiotoxizität sogar zu einem verstärkten Zellüberleben und verbesserte die kardiale Funktion [144]. Im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit verwendeten *Liu et al.* in diesem Modell Doxorubicin (Dox, 22,5 $\mu\text{g/g}$ KG i.p.) als herzscheidendes Agens und die PFT- α -Gabe erfolgte deutlich früher, entweder 30 min vor oder 3 h nach der Dox-Applikation. Daher ist es möglich, dass die PFT- α -Wirkung abhängig von der Art der Herzschädigung ist, und eine Dosisanpassung an die jeweilige Schädigungsart notwendig macht.

Daneben könnte aber auch der **Zeitpunkt und die Dauer der Pifithrin- α -Gabe** für seine Wirkung bedeutend sein. In dieser Arbeit wurde PFT- α über sechs Tage appliziert und das Überleben der Mäuse insgesamt eine Woche nach dem Infarkt ereignis beobachtet. In einem Infarktmodell der Ratte wurde die Letalität über sechs Wochen nach MI gemessen. Es verstarben 32 % der Tiere innerhalb dieser Zeitspanne, wobei davon wiederum mehr als 50 % in den ersten 6 d nach MI starben [158]. Auch Infarktmodelle an Mäusen zeigen ähnlich hohe Letalitätsraten in dieser frühen Postinfarktperiode [162]. Damit stellt die erste Woche nach MI auch bei Mäusen den wohl kritischsten Zeitraum für die Postinfarkt-Letalität dar, und eine Behandlung in dieser Zeit erscheint sinnvoll.

In mehreren Studien in der Literatur wurde ein sehr früher Applikationszeitpunkt für PFT- α gewählt, die Gabe erfolgte z.T. sogar schon vor dem Infarkt ereignis [145, 160]. Ein Herzinfarkt jedoch findet meist überraschend statt, und es vergeht häufig etwas Zeit bis er erkannt wird und eine klinische Behandlung möglich ist. Der in dieser Arbeit verwendete Zeitpunkt der PFT- α -

Injektion – nach dem Infarkt – sollte in erster Linie eine realistische Anwendbarkeit dieser Substanz widerspiegeln.

Nachdem es überraschenderweise unter PFT- α (4,4 $\mu\text{g/g}$) zu einem vermehrten Versterben der Mäuse gekommen war, wurden die vorzeitig verstorbenen Tiere hinsichtlich ihrer Todesart untersucht. Bei der Eröffnung des Brustraumes der Mäuse fielen große Blutkoagel auf, welche als das Ergebnis von **Herzrupturen** betrachtet werden können. Tatsächlich stellt die Herzruptur eine häufige Todesursache in den ersten Tagen nach einem MI dar [163]. In einem vergleichbaren Mausmodell starben 18 % der Tiere in der ersten Woche nach dem MI und bei allen betroffenen zeigten sich in der Autopsie kardiale Rupturen [158]. In einer weiteren Studie lag die Herzrupturrate der Mäuse sogar bei 39 % [162].

Interessanterweise werden Ventrikelrupturen offenbar deutlich häufiger bei Mäusen als bei anderen Versuchstieren wie Ratten, Kaninchen, Schweinen usw. beobachtet [158, 163], was die Aussagekraft der Herzrupturrate im Mausmodell in Bezug auf die Situation beim Menschen einschränken mag. Dennoch ist die Ventrikelruptur auch beim Menschen für einen relevanten Anteil der Postinfarkt-Letalität verantwortlich. Sie tritt ebenso bevorzugt in der ersten Woche nach den Infarktsymptomen auf und macht 5–30 % der intrahospitalen Letalität nach einem akuten MI aus [164]; bei Autopsien im Rahmen klinischer Versuche zu thrombolytischen Therapien konnten Ventrikelrupturen sogar in bis zu 38 % der Fälle beobachtet werden [165].

Bei der Organisolierung am siebten postoperativen Tag konnten in allen Versuchsgruppen keine weiteren Ventrikelrupturen beobachtet werden.

Die mit 2,2 $\mu\text{g/g}$ PFT- α behandelten Tiere starben in diesen Experimenten zwar nicht vermehrt in den sechs Tagen nach der LAD-Ligatur, dennoch stellte sich der Verlauf ihrer **Überlebenskurve** unterschiedlich gegenüber der Kontrollgruppe dar. Während der Tod der Kontrolltiere ausschließlich auf die ersten 3 d nach dem Infarkt beschränkt war, starben die PFT- α -Mäuse (auch die der höheren Dosis) relativ gleichmäßig über den Zeitraum von einer Woche verteilt. Unter normalen Bedingungen findet in den ersten 3d nach einem MI das frühe Remodeling des Herzmuskelgewebes statt [19], welches gekennzeichnet ist durch eine Infarktexpansion und einen erhöhten ventrikulären Wandstress. Daher stellt diese frühe Phase die größte Gefahr für Ventrikelrupturen dar, während Anpassungsvorgänge des Gewebes spätere Rupturen unwahrscheinlicher machen [19]. Dennoch können in den eigenen Experimenten unter PFT- α nicht nur in den ersten 72 h nach der LAD-Ligatur, sondern über die gesamte Woche verteilt Herzrupturen beobachtet werden. Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass Pifithrin- α den Remodelingprozess negativ beeinflussen und seinen typischen Ablauf verändern könnte.

Die Herzruptur tritt typischerweise nach transmuralen Infarkten auf und resultiert aus einer kontinuierlichen Ventrikeldehnung und einer strukturellen Verdünnung der infarzierten Herzwand

[166]. Eine Messung der **Wanddicken** des linken Ventrikels kann nicht nur die Bestimmung der Infarktlokalisierung unterstützen, sondern vielmehr auch von prognostischer Bedeutung im Hinblick auf die Auftretenswahrscheinlichkeit einer Herzruptur sein.

Veränderungen der Wandarchitektur der Mäuseherzen wurden in dieser Arbeit sowohl echokardiographisch an den noch lebenden Tieren als auch mikroskopisch nach der Organisolierung erfasst. Bei der histologischen Wanddickenuntersuchung wurden Schnitte in verschiedenen Ebenen zwischen Apex und Basis der Herzen betrachtet. Dabei fiel in beiden Untersuchungsgruppen und an allen freien Wänden des LV eine Dickenabnahme von basal nach apikal auf. Lediglich das Septum interventriculare zeigte in allen Ebenen eine konstante Dicke.

Beim Vergleich der Wände des LV war die Vorderwand der Kontrollherzen in der mikroskopischen Untersuchung nur $0,3 \pm 0,1$ mm dick (apikal, Position 1) und damit tendenziell dünner als Lateralwand ($0,4 \pm 0,1$ mm), Hinterwand ($0,5 \pm 0,1$ mm) und interventrikuläres Septum ($0,9 \pm 0,2$ mm). Diese Befunde bestätigen damit die echokardiographischen Ausmessungen, bei denen sich ebenfalls dieser Trend fand: in der Diastole ergab sich eine mittlere Vorderwanddicke von $0,4 \pm 0,1$ mm (Kontrolle), während die Werte in der Hinterwand bei $0,7 \pm 0,1$ mm lagen.

Anhand der histologischen Untersuchungen kann die schon intraoperativ beobachtete antero-apikale Infarktlokalisierung bestätigt werden. Besonders stark ist die Ventrikel-Vorderwand ausgedünnt, was diesen Bereich anfällig für weitere Komplikationen, wie Herzrupturen, macht. Außerdem handelt es sich um sehr große, ausgedehnte Infarkte, die auch die Lateral- und Hinterwand des Ventrikels mit einbeziehen.

Die beschriebenen Lokalisationen der Läsionen konnten in sehr ähnlicher Weise auch in anderen MI-Modellen der Maus beobachtet werden [159]. Allein das Septum interventriculare wurde durch den Infarkt nicht beeinflusst. Dies erscheint auf den ersten Blick verwunderlich, da die LAD beim Menschen, einen Normalversorgungstyp vorausgesetzt, neben dem LV auch große Anteile des interventrikulären Septums versorgt [18]. Hierbei sollten wiederum Limitierungen des Mausmodells berücksichtigt werden, da eine abweichende Koronaranatomie der Maus auch in Unterschieden der Infarktregionen resultiert. *Kumar et al.* beschrieben die Existenz einer zusätzlichen septalen Koronararterie, die entweder aus einem separaten Ostium des rechten Sinus oder aus der rechten Koronararterie abzweigt [167]. Während die linke Koronararterie apikale, anteriolaterale und posteriore Regionen des Herzens versorgt, übernimmt diese septale Koronararterie die Hauptversorgung des interventrikulären Septums.

Im Vergleich zwischen der Kontroll- und der PFT- α ($2,2 \mu\text{g/g}$)-Gruppe zeigten sich allerdings keine signifikanten Veränderungen zwischen den Wanddicken des Ventrikels. Lediglich die anteriore Wand in den apikalen Segmenten (Positionen 1 und 2) zeigte in der Systole unter PFT- α einen noch stärkeren Trend zur Ausdünnung, was auf eine noch stärkere Infarzierung durch Pifithrin- α hindeuten könnte.

Zum genaueren Vergleich der Infarktausdehnung erfolgte eine Ausmessung der **Infarktgrößen** an den zuvor mittels Trichrome gefärbten Präparaten. Dazu wurde in jedem Herz das infarzierte Gebiet endo- und epikardial ausgemessen und in Relation zur gesamten Zirkumferenz des linken Ventrikels gesetzt. Die mittlere Infarktgröße der Kontrollmäuse lag bei $51 \pm 3 \%$. In ähnlichen Tierstudien wurden Infarktgrößen in einer großen Spanne zwischen 8 und 65 % angegeben [159], so dass zur besseren Vergleichbarkeit oft eine weitere Unterteilung in kleine, mittlere und große Infarkte verwendet wurde. Eine Studie am Mausmodell bezeichnete Infarkte mit einer Ausdehnung unter 40 % als *moderate* und eine Infarktgröße von über 40 % als *large* [158]. Die *großen* Infarkte wiesen im Durchschnitt Werte von $51,5 \pm 8,4 \%$ auf, was vergleichbar zu den in den eigenen Experimenten gemessenen Infarktgrößen der Kontrolltiere ist, es handelt sich nach oben verwendeter Einteilung also um *große* Infarkte. In einer Studie von *Bayat et al.* konnte gezeigt werden, dass es erst bei Infarktgrößen $> 30 \%$ zu signifikanten Veränderungen von Funktion und Ventrikelarchitektur an Mäuseherzen kommt [168].

Der Mittelwert der Infarktgröße der mit PFT- α (2,2 $\mu\text{g/g}$) behandelten Mäuse ist in der vorliegenden Arbeit mit $62 \pm 3 \%$ signifikant größer als der der Kontrolltiere. Diese Zunahme der Infarktgröße unter PFT- α kann eine mögliche Erklärung für das vermehrte Versterben in Folge von Herzrupturen unter Pifithrin- α abgeben.

Die Infarktgröße wurden nach dem Studienprotokoll allerdings nur an den Herzen der Mäuse bestimmt, welche nicht vorzeitig ablebten. Da unter der hohen PFT- α -Dosis von 4,4 $\mu\text{g/g}$ jedoch keines der Versuchstiere das Ende der Beobachtungszeit erreicht hat, lässt sich zu dieser Versuchsgruppe keine Aussage in Bezug auf die exakte Infarktausdehnung treffen. Trotzdem kann vermutet werden, dass die Infarktausdehnung der mit der höheren PFT- α -Dosis behandelten Tiere mit ähnlichen Werten, wenn nicht sogar noch größeren Werten, einherging. Diese These wird indirekt durch eine Studie von *Cremers et al.* unterstützt, in der gezeigt wurde, dass Patienten mit einer ausgeprägten Infarktexpansion auch mehr Folgekomplikationen wie kongestive Herzinsuffizienz und kardiale Rupturen erlitten und dadurch vermehrt verstarben [169]. Die Zunahme der Infarktausdehnung unter PFT- α steht allerdings im Kontrast zu anderen Studien, die die Beeinflussung der Infarktgröße unter dieser Substanz untersuchten [143, 160]. In einer Studie der ischämischen Prekonditionierung vor MI wurde PFT- α an isolierten Herzen verabreicht, wobei es zu signifikant geringeren Infarktgrößen unter dem Einfluss von Pifithrin- α kam ($50,2 \pm 5 \%$ in Kontrollgruppe vs. $28,2 \pm 3 \%$ in PFT- α -Gruppe, $p < 0,01$, [160]). Es handelte sich hier aber um ein Ischämie-Reperusionsmodell an männlichen Ratten mit einer einmaligen, hohen PFT- α -Gabe (10 μM = 2860 μg bei 350-400 g KG [= 7,2-8,2 $\mu\text{g/g}$]) welche zeitnah vor bzw. nach der Ischämie erfolgte. Auch hier könnten der unterschiedliche Applikationszeitpunkt und die nur transiente Ischämie für die verschiedenen Ergebnisse verantwortlich sein.

Die Infarktgröße ist nicht nur mit dem Auftreten von Folge-Komplikationen assoziiert, sondern es besteht gleichzeitig eine starke Korrelation mit der Beeinträchtigung der linksventrikulären Funktion [170]. Zur Untersuchung der Herzfunktion in vivo wurde in den vorliegenden Experimenten am siebten postoperativen Tag eine Herz-**Echokardiographie** der noch lebenden Mäuse durchgeführt.

Die mittlere Herzfrequenz der Kontrollgruppe lag bei $496 \pm 19 \text{ min}^{-1}$. In vergleichbaren Mausmodellen wurden nach Herzschädigungen echokardiographisch (MI durch LAD-Ligatur, [159]) oder elektrokardiographisch (Zytostatika-induzierte Kardiotoxizität, [144]) ähnliche Frequenzen zwischen 400 und 500 min^{-1} gemessen. Unter Pifithrin- α zeigte sich in den vorliegenden Experimenten im Vergleich zur Kontrollgruppe die Tendenz einer Frequenzzunahme auf $543 \pm 20 \text{ min}^{-1}$ ($p = 0,09$ vs. Kontrolle), was vermuten lässt, dass die mit dieser Substanz behandelten Mäuse einer vergleichsweise höheren Stresssituation ausgesetzt waren. Zudem lässt sich die unter Pifithrin- α gemessene größere Infarktausdehnung mit einer reflektorischen Zunahme der Herzfrequenz bei verminderter Auswurfleistung vereinbaren.

Mit einer EF von $33 \pm 6 \%$ und einer FAC von $30 \pm 5 \%$ war die Pumpfunktion der infarzierten Herzen im Vergleich zu gesunden Tieren erwartungsgemäß eingeschränkt.

Während die EF bei gesunden Tieren bei etwa 60 % liegt, sank sie in einer Studie von *Lloyd et al.* auf nur noch 17 % nach permanenter LAD-Okklusion bei entsprechenden Infarktgrößen von durchschnittlich 65 % [171]. Dies würde auch erklären, dass sich bei der Bestimmung der EF in dieser Arbeit der Trend einer weiteren Verschlechterung unter PFT- α zeigte, da es sich hier um signifikant größere Infarkte als in der Kontrollgruppe mit wahrscheinlich ausgeprägterer Schädigung der Ventrikelarchitektur handelte. Obwohl die echokardiographisch erhobenen Daten keine Signifikanz aufwiesen, ist in Anbetracht der bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit eine tatsächliche Frequenzzunahme und die Abnahme der Pumpfunktionsparameter der Herzen unter Pifithrin- α vorstellbar.

Auf der Suche nach der Ursache für die größere Infarktausdehnung unter PFT- α wurden die **Apoptose der Kardiomyozyten** im Randbereich des Infarktes (LV) und im nicht-infarzierten Gebiet (Septum interventriculare) genauer untersucht. P53 ist ein zentraler Aktivator der Apoptosekaskade und seine Hemmung wurde mit einer gleichzeitigen Apoptoseinhibition in Verbindung gebracht [94, 95]. Eine hemmende Wirkung von p53 und der KM-Apoptose durch PFT- α wurde in mehreren Studien beschrieben [130, 144, 145] und sollte auch in dieser Arbeit untersucht werden.

Zur Darstellung apoptotischer Herzmuskelzellen diente eine immunhistologische Färbung, in der aktivierte Caspase 3, die als Effektorcaspase ein Schlüsselenzym der Apoptose-Kaskade darstellt [63], visualisiert wurde. In der Kontrollgruppe konnten in der Umgebung des Infarktgebiets 0,05 % apoptotische KM nachgewiesen werden. Dieser Wert wirkt auf den ersten Blick

äußerst gering. Dennoch handelt es sich um eine gegenüber nicht-infarzierten Bereichen des Herzens stark gesteigerte Apoptoserate, da im interventrikulären Septum mit 0,01 % signifikant weniger apoptotische KM nachgewiesen werden konnten. Diese Werte bestätigen erneut, dass der apoptotische Zelltod am Untergang der KM nach einem Herzinfarkt beteiligt ist, und diese Form des Zelltods kann, wenn auch nur in geringem Ausmaß, ebenso in nicht-infarzierten Gebieten des Herzens nach MI beobachtet werden.

Die Caspase 3 stellt nach Aktivierung als Effektorcaspase – und damit Teil der gemeinsamen Endstrecke aller drei beschriebenen Apoptosewege (vgl. 1.3.2.) – ein geeignetes Substrat zur Antikörperbindung und Markierung der Apoptose der KM dar. In einem transgenen Mausmodell mit einer Überexpression dieser Caspase und Ischämie-/Reperfusionbedingungen konnte sowohl ein vermindertes Überleben der Tiere als auch ein Anstieg der Infarktgröße beobachtet werden [172], was auf eine gesteigerte Apoptose zurückgeführt werden konnte.

Dennoch ist als Nachteil der Anti-aktivierte Caspase 3-Immunfärbung zu bedenken, dass nur diejenigen Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Fixierung (am siebten postoperativen Tag) in der Apoptose befanden, markiert werden konnten. Damit werden Zellen, die bereits in den Tagen zuvor apoptotisch abgebaut wurden, genauso wie Zellen, welche zu einem späteren Zeitpunkt der Apoptose unterliegen, nicht berücksichtigt. Die Gesamtrate zwischen dem Infarkt ereignis und dem siebten Tag nach dem Infarkt sollte daher noch höher liegen.

Es wird angenommen, dass der apoptotische Zelltod relativ früh, noch einige Zeit vor einer maximal ausgeprägten Nekrose, seinen Maximalwert erreicht [80]. Eine genauere Festlegung dieses Zeitraums erfolgte in einer Untersuchung von *Cheng et al.*, in welcher das Ausmaß des programmierten Zelltods zu verschiedenen Zeitpunkten (nach 3-12 h, nach 1-2 d, nach 7 d, nach 14 d usw.) innerhalb eines Monats nach MI anhand des Nachweises von DNA-Strangbrüchen (mittels *terminal deoxynucleotidyl transferase assay* und elektrophoretischem *DNA-laddering*) erfasst wurde [83]. Dabei zeigten sich – in Konsens mit vorangehenden Studienergebnissen [77] – nach 1-2 Tagen die höchsten Raten (0,07 %), die allerdings auch nach 7 Tagen noch deutlich höher lagen als zu den anderen gemessenen Zeitpunkten. Sieben Tage nach dem Infarkt ereignis lagen die Raten im Grenzbereich des Infarktes mit 0,04 % deutlich über den im infarktfernen Myokard gemessenen Werten ($< 0,01$ %) [83].

In den eigenen Untersuchungen wurden in den Herzen der mit PFT- α behandelten Gruppe nur geringe Apoptoseraten von insgesamt 0,01 % gemessen. Auch hier waren die Raten im Grenzbereich des Infarktes im linken Ventrikel (0,02 %) signifikant größer als im infarktfernen Septum interventriculare (0,01 %, $p < 0,05$). Im Vergleich zur Kontrollgruppe kam es unter der PFT- α -Behandlung im linken Ventrikel zu einer signifikanten Abnahme des Anteils apoptotischer KM (Kontrolle: LV = 0,05 %, $p < 0,05$).

Damit konnten die Ergebnisse die erwartete Apoptose-hemmende Wirkung von Pifithrin- α bestätigen. Sie waren zudem im Einklang mit zahlreichen Studien, die die Apoptoseinhibition

durch PFT- α nicht nur in Herzmuskelzellen, sondern auch in verschiedenen anderen Geweben nachwiesen [130, 133, 138, 140, 149].

Untersuchungen zur Apoptose am Myokard erfolgten auch durch die Arbeitsgruppe um *Liu* [143-145]. Sie induzierten die Apoptose entweder durch Doxorubicin oder im Rahmen eines Ischämie-Reperusions-Modells, und PFT- α führte neben der Apoptosehemmung auch zu einer Verkleinerung des Infarktgebiets und zu einer Verbesserung der kardialen Funktion.

Während die Apoptosehemmung durch PFT- α sich in anderen Studien positiv auf die Funktionen des Herzmuskelgewebes auswirkte, kam es in dieser Arbeit zu größeren Myokardinfarkten und Letalitätsraten unter dieser Substanz. Es kann ausgeschlossen werden, dass die günstige Beeinflussung der Apoptose durch Pifithrin- α die Erklärung für das signifikant schlechtere *Outcome* der Behandlungstiere darstellt. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass die Substanz neben der Apoptosehemmung der KM weitere Strukturen oder Mechanismen im Herzmuskelgewebe beeinflusst haben muss, die sich stärker auf das Remodeling auswirken als die kardioprotektiven Effekte der Apoptosehemmung.

Eine mögliche Erklärung ist die Beobachtung, dass es unter bestimmten Voraussetzungen zu einem Wechsel der Art des Zelltods kommen kann. So wurde bei mangelnder ATP-Konzentration, bei langer Persistenz der Todesstimuli, aber auch bei Blockade der Apoptose ein Übergang dieses Zelltods in die Nekrose beschrieben [45, 95]. Zusätzlich kann p53 neben der Apoptose auch den Autophagie-assoziierten Zelltod aktivieren. Dabei handelt es sich um eine weitere Art des programmierten Zelltods [49], deren Bedeutung nach Herzerkrankungen zunehmend Aufmerksamkeit geschenkt wird [173]. Es ist daher möglich, dass die KM anstelle durch die Apoptose durch eine alternative Art des Zelltods zugrunde gegangen sind. Da bei der Aktivierung des Autophagie-assoziierten Zelltods oder der Nekrose Caspasen keine Rolle spielen, wären diese Zelltodformen des Herzmuskelgewebes auch nicht mittels der Anti-aktivierte Caspase 3-Färbung erfasst worden.

Außerdem ist p53 nicht nur ein Schlüsselprotein der Apoptose, sondern es ist auch in weitere intrazelluläre Regulationsmechanismen involviert. Eine wichtige Rolle spielt es bei der Regulierung des **Zellzyklus**, wo p53 einen reversiblen oder irreversiblen Zellarrest **der KM** vermitteln kann, indem es auf seine Kontrollpunkte wirkt [100]. Daher wäre es denkbar, dass die Hemmung dieses Kernproteins den Zellzyklusarrest lockert. Die Untersuchung der Zellzyklusaktivität der KM erfolgte in dieser Arbeit durch die Anti-BrdU-Färbung, wobei das Thymidin-Analogon BrdU in replizierende Zellen eingebaut wird und sich anschließend die proliferierenden Zellen immunhistochemisch markieren lassen. In den Herzen der Kontrollgruppe waren insgesamt 0,02 % der Zellen BrdU-positiv. Die DNA-Synthese trat ähnlich wie bei den apoptotischen KM bevorzugt im infarktnah gelegenen Gebiet des linken Ventrikels auf (0,03 %), obwohl trotz eines starken Trends keine Signifikanz nachgewiesen werden konnte ($p = 0,06$ vs. Septum interventriculare). Es konnte in verschiedenen Studien zuvor gezeigt wer-

den, dass die KM auch ohne Herzschädigung in geringem Maße zur Zellteilung fähig sind. *Soonpa et al.* beschrieben dabei Raten um 0,0005 % [33]. Die in dieser Arbeit erfassten Werte der KM-Replikation liegen damit deutlich über denen gesunder Herzen, so dass sich eine gesteigerte DNA-Synthese nach MI vermuten lässt. Auch in anderen Experimenten kam es nach verschiedenartigen Schädigungen adulter Mäuseherzen zu einer erhöhten DNA-Synthese der KM gegenüber unbeschädigten Herzen [35]. Insbesondere im Randgebiet von Infarkten wurden hohe Replikationsraten beschrieben, die allerdings je nach Studie in einer großen Spanne zwischen 0,0083 und 0,5 % lagen (zusammengefasst in [35]). Die Beeinflussung der DNA-Synthese nach einem Herzinfarkt wurde auch in menschlichen KM von verstorbenen Patienten genauer untersucht [29]. Das nukleäre Antigen Ki-67, ein Marker für Zellzyklusaktivität, konnte dabei in 4 % der Kerne im Randbereich von Infarkten und in 1 % der Kerne des infarktfernen Myokards nachgewiesen werden. Da Ki-67 allerdings in allen Phasen des Zellzyklus exprimiert wird, handelt es sich wahrscheinlich um deutlich höhere Werte als bei der alleinigen Betrachtung der Replikationsphase mittels BrdU. Dennoch kann hier ein ähnlicher Trend der verstärkten Zellzyklusaktivität am Rande des Infarkts beobachtet werden.

Unter der PFT- α -Applikation kam es im Randbereich des Infarktes tendenziell zu einer geringeren Anzahl BrdU-positiver KM im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies steht in Kontrast zu den Ergebnissen einer Studie mit einem transgenen Mausmodell, in welcher der Zellzyklusarrest von KM durch die p53-Hemmung nach MI aufgehoben und der KM-Zellzyklus reaktiviert werden konnte [108]. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass bei den transgenen Mäusen Anpassungsprozesse an die veränderte Genexpression erfolgten, welche für eine unterschiedliche Beeinflussung des Zellzyklus nach MI verantwortlich waren.

Insgesamt lieferte auch die Analyse des Zellzyklus der KM keine Erklärung für die in dieser Arbeit beobachteten ausgedehnteren Infarkte unter Pifithrin- α .

Als nächster Schritt in dieser Arbeit wurde die zelluläre Struktur des Infarktgebiets näher untersucht. Da die Herzmuskelzellen zahlenmäßig nur 20 % der im Herzen präsenten Zellen ausmachen [41], wurde die Aufmerksamkeit hierbei auch auf andere Zellen des kardialen Gewebes gelenkt. Während es in der frühen Postinfarktphase zu einer massiven Einwanderung von Entzündungszellen kommt, sind Myofibroblasten und Makrophagen am Aufbau der Infarkt Narbe beteiligt, und zuletzt sind in der verbleibenden Narbe fast nur noch Fibroblasten zu finden [85, 86].

Nach Anwendung der Hämatoxylinfärbung erfolgte die Auszählung der **Gesamtzahl der Zellen** bzw. Zellkerne der Infarkt Narbe im Vergleich zwischen der Kontroll- und Behandlungsgruppe. In den Kontrollherzen befanden sich im Mittel 837 ± 59 Zellen pro mikroskopischen Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung.

In einer Studie, welche die Rolle der interstitiellen Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Koronarokklusion an Kaninchenherzen untersuchte, stieg die Gesamtzellzahl im Infarkt-

bzw. Narbengebiet in den ersten zwei Wochen nach dem Infarkt an und fiel nach vier Wochen schon wieder deutlich ab [86]. Daher wird die in dieser Arbeit erfasste Gesamtzellzahl der Infarktnarbe wahrscheinlich einen im Zeitraum des kardialen Remodelings vergleichsweise hohen Wert widerspiegeln.

Unter der Behandlung mit PFT- α konnten dagegen mit 637 ± 62 (pro mikroskopischen Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung) signifikant weniger Zellen in der Infarktnarbe gezählt werden ($p < 0,05$). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass PFT- α nicht nur auf die KM des Herzmuskelgewebes wirkt, sondern vielmehr Effekte auf die Gesamtzahl der Zellen ausübt.

In einer jüngeren Studie zur Untersuchung der Entzündungsreaktion unter Ischämie-Reperfusion-Bedingungen, konnte eine herabgesetzte Leukozytenzahl im ischämischen Risikogebiet unter dem Einfluss von Pifithrin- α beobachtet werden [143]. In dieser Studie wurden die Versuchstiere allerdings nach einer 30-minütigen Ischämie und einer anschließenden 24 Stunden andauernden Reperfusionphase getötet. Somit wurde die Leukozytenzahl und ihre Beeinflussung durch PFT- α in einer sehr frühen Infarktphase gemessen, in der Leukozyten mehr als 60 % der gesamten interstitiellen Zellen ausmachen [86]. Obwohl im Gegensatz dazu in der vorliegenden Arbeit die Gesamtzellzahl betrachtet wurde, deutete die Studie von *Liu et al.* zumindest an, dass neben den KM auch andere Zellen des Infarktgewebes von PFT- α entscheidend beeinflusst werden. Dennoch wurde die herabgesetzte Leukozytenzahl in dem beschriebenen Experiment mit kardioprotektiven Prozessen in Verbindung gebracht, während die erniedrigte Zellzahl in dieser Arbeit eher einen negativen Einfluss auf das Remodeling und die Infarktexpansion haben sollte.

Es stellt sich die Frage, wie die erniedrigte Zellzahl der PFT- α (2,2 $\mu\text{g/g}$)-Gruppe zustande kam – handelte es sich um eine verminderte Zellteilung oder kam es im Herzgewebe der Behandlungsgruppe zu einer gesteigerten Apoptose?

In der Infarktnarbe der Kontrolltiere konnten insgesamt 0,04 % (aktivierte) Caspase-positive, d.h. apoptotische Zellen, gezählt werden. Dieser Anteil entspricht in etwa jenem, der auch bei der Betrachtung der KM beobachtet werden konnte (vgl. 4.7.) und lässt vermuten, dass die **Apoptose** auch **bei anderen Zellarten** nach Myokardinfarkt eine Rolle spielt. Auch in verschiedenen früheren Studien konnte in den Nicht-KM eine verstärkte Apoptose nach einem akuten MI nachgewiesen werden [85, 86]. Sie soll in der Postinfarktphase beteiligt sein am Abbau der eingewanderten Entzündungszellen und unterstützt in einer späteren Phase den Abbau der im Rahmen der Narbenbildung proliferierten interstitiellen Zellen [85]. Die zuvor beschriebene Studie von *Takemura et al.* konnte zeigen, dass es, analog zu den Beobachtungen an KM [80], vorwiegend in den ersten Tagen nach einem MI zu einem vermehrten apoptotischen Zelltod der interstitiellen Zellen kommt [86]. Die gemessene Apoptoserate war hier 2 Tage nach dem Infarkt signifikant größer als vier Wochen später.

Bei der Behandlung mit PFT- α lag der Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtzellzahl der Infarkt Narbe bei 0,06 %. Damit ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zu den Ergebnissen der Kontrolltiere, so dass der Apoptose keine Rolle bei der Veränderung der Zellzahl der Infarkt Narbe unter dieser Substanz zugeschrieben werden kann.

Bei der Betrachtung des **Zellzyklus** ließen sich in der Kontrollgruppe 18 % aller Zellen der Infarkt Narbe als BrdU-positiv nachweisen. Dieser Anteil liegt weit über den Raten, die bei den KM allein gemessen wurden (0,03 %), und spricht für eine starke Zellzyklusaktivität der interstitiellen Zellen. Die Werte deuten auf starke Umbauvorgänge des Infarktgebiets eine Woche nach der LAD-Ligatur hin.

Interessanterweise kam es in den Herzen der Tiere mit PFT- α (2,2 $\mu\text{g/g}$)-Injektion, wo sich nur 12 % der Zellen mit BrdU markieren ließen, zu einer hoch signifikant geringeren Replikationsrate ($p < 0,001$). Dies führt zu der Hypothese, dass Pifithrin- α nach einem Myokardinfarkt den Zellzyklus der interstitiellen Zellen hemmt und somit zu einer Abnahme der Zellzahl des Infarktgebiets führt. Die Abnahme der Gesamtzellzahl wiederum könnte sich negativ auf die Reparaturprozesse des Infarktgebietes und auf die Ausbildung einer stabilen Infarkt Narbe auswirken. Letztendlich entsteht unter PFT- α offenbar ein instabiles Ersatzgewebe, dass zu einer größeren Infarktexpansion und einer vermehrten Anzahl von kardialen Rupturen führt.

Auf der Suche nach den zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der beobachteten Veränderungen nach PFT- α -Applikation erfolgte als letzter Schritt dieser Arbeit die Analyse der **mRNA-Expressionsmuster**.

Zur Beurteilung von Apoptose-assoziierten Genen wurden die Expressionen von Bax, Apaf-1 und Caspase 6 untersucht. In dieser Arbeit zeigte sich bei den Kontrolltieren ein starker Trend der vermehrten Expression von Bax und Caspase 6 im Infarktgebiet gegenüber dem infarktfernen Myokard (für beide: $p = 0,08$). Dieser Trend konnte auch bei der Bax-Expression der mit Pifithrin- α behandelten Tieren beobachtet werden ($p = 0,05$), die Caspase 6-Expression war nach Behandlung mit PFT- α im Infarktgebiet sogar signifikant höher als in weiter entfernt gelegenen Anteilen des linken Ventrikels bzw. des interventrikulären Septums ($p < 0,05$).

Bax gehört zu den pro-apoptotischen Mitgliedern der Multi-Domänen-Proteine der Bcl-2-Familie, die während der Apoptose an der Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran beteiligt sind [54, 174]. Es gibt verschiedene Studien, die sowohl eine transkriptionsabhängige als auch eine transkriptionsunabhängige Regulierung von Bax im Rahmen der Apoptosekaskade postulieren, wobei p53 bei beiden eine entscheidende Rolle spielen soll [99, 175]. Caspase 6 gehört zu den Effektorcaspasen mit kurzer Prodomäne [176] und gehört ebenso zu den Zielstrukturen des Transkriptionsfaktors p53 [177, 178]. Die vermehrte Expression dieser Apoptose-assoziierten Gene deutet auf eine Zunahme der apoptotischen Zellen im infarzierten linken Ventrikel hin, und beide Gene werden nach den Ergebnissen dieser Arbeit wahr-

scheinlich im Rahmen der p53-Hemmung durch Pifithrin- α beeinflusst. Die Ergebnisse der mRNA-Analysen unterstützen somit die der histologischen Betrachtung der Kardiomyozyten, denn auch hier konnte in beiden Untersuchungsgruppen eine signifikant höhere Apoptoserate in den infarktnahen Arealen als in den infarktfern gelegenen Gebieten gemessen werden (siehe oben).

Im Vergleich zu den anderen untersuchten Genen wurde Apaf-1 (unabhängig von der Lokalisation im Herzen) nur auf einem sehr niedrigen Level exprimiert. Apaf-1 ist ein zytosolisches Protein, das einen Bestandteil des Apoptosoms bildet, welches die Caspase 9 aktiviert [53]. Über ein *p53-responsive element* stellt es ein direktes Transkriptionsziel von p53 dar und seine Expression ist streng p53-abhängig [177]. Die Rolle von Apaf-1 wurde bisher im Wesentlichen auf die Apoptose beschränkt betrachtet [179], wobei in einer neueren Studie auch eine *pro-survival*-Rolle im Rahmen der Regulierung der Centrosom-Reifung beschrieben worden ist [180]. Innerhalb der Apoptosemaschinerie sind vielfache Interaktionen mit z.T. auch anti-apoptotischen Faktoren wie Bcl-XL und Boo/Diva [181] bekannt.

Es ist unklar, warum Apaf-1 bei einer signifikant gesteigerten Apoptose im Infarktgebiet der Kontrollgruppe (vs. Septum interventriculare) nicht auch verstärkt exprimiert wurde. Eine Möglichkeit ist die Beeinflussung des Proteins durch andere unbekannte Inhibitoren schon auf Transkriptionsebene, eine andere stellt eine für die Erreichung eines Signifikanzniveaus noch nicht ausreichende Materialmenge dar. Zudem konnte lediglich an einem Zellkulturexperiment (von 1 d-alten Ratten) der Anstieg von Apaf-1 nach anhaltender Ischämie nachgewiesen werden [182]. Sonst existieren keine ähnlichen in-vivo-Modelle, die die Rolle von Apaf-1 nach Myokardinfarkt untersuchen, so dass seine Bedeutung in diesem Zusammenhang fraglich ist.

Als Marker des Zellzyklus wurden die drei Cycline A, B2 und D2 untersucht, und ihre Kopienanzahl wurde in Relation zur Expression von GAPDH gemessen.

Während die D-Typ-Cycline zu Beginn des Zellzyklus in der frühen G1-Phase aktiv sind, bildet sich der CDK-2-Cyclin A-Komplex in der späten S-Phase und führt die Zelle in die G2-Phase. Cyclin B2 markiert letztendlich die Mitosephase, in der es in einem Komplex mit CDK-1 wirksam wird [27]. Somit wurden Gene mit Expressionsprodukten in verschiedenen Phasen des Zellzyklus untersucht.

Sowohl in der Kontroll- als auch in der PFT- α -Gruppe waren die Expressionsraten der Cycline im Infarktgebiet signifikant größer als im nicht-infarzierten Gebiet ($p < 0,05$). Dies lässt auf eine verstärkte Aktivierung des Zellzyklus im Infarktgebiet schließen. Diese Ergebnisse unterstützen somit die der histologischen Untersuchungen, bei denen der Trend einer verstärkten Zellzyklusaktivität der KM der Kontrollgruppe in den infarktnah gelegenen Myokard gegenüber den infarktfernen Arealen beobachtet werden konnte.

Unter dem Einfluss von Pifithrin- α sanken die Expressionsraten aller drei untersuchten Cycline. Dieses Ergebnis trat in Übereinstimmung zu dem der Analyse der Gesamtzellzahl der Infarkt-narbe auf, wo eine verringerte Replikationsrate unter PFT- α beobachtet werden konnte. Die Hemmung des Zellzyklus unter dieser Substanz könnte über die Beeinflussung von p53 vermittelt werden, da die Wirkung von p53 auf die Expression verschiedener Zellzyklus-assoziiierter Gene [100] ebenso beschrieben wurden ist wie die p53-hemmende Funktion von PFT- α [130, 183].

Bei genauer Betrachtung ergibt sich jedoch ein Widerspruch bezüglich der bisher beschriebenen Funktion von p53. Die Ergebnisse der eigenen Arbeit würden Zellzyklus-aktivierende Eigenschaften von p53 voraussetzen, welche durch PFT- α gehemmt werden. Dennoch kann es als allgemein anerkannt gelten, dass p53 eher den Zellzyklusarrest aufrecht erhält als als Aktivator des Zellzyklus zu fungieren [100].

Eine mögliche Erklärung für die Resultate dieser Arbeit wäre, dass p53 unter verschiedenen Voraussetzungen auch unterschiedliche Funktionen erfüllt. Andererseits wäre es möglich, dass Pifithrin- α in der Regulierung des Zellzyklus neben p53 auf weitere Regulationsproteine der Zelle Einfluss nimmt. Es konnte z.B. schon vor einigen Jahren gezeigt werden, dass PFT- α nicht nur das Kernprotein p53 hemmt, sondern auch p53-unabhängig auf andere Zellregulatoren wie Transkriptionsfaktoren oder Hormonrezeptoren wirken kann [148].

Trotz einer signifikant gesteigerten Gesamtzellzahl und erhöhter Expressionsraten der Cycline im Infarktgebiet liefern die hier erhobenen histologischen und molekularbiologischen Daten jedoch keinen hinreichenden Hinweis darauf, dass durch PFT- α der Zellzyklusarrest von Kardiomyozyten nach MI aufgehoben werden kann.

Zusammenfassend kommt es in dieser Arbeit unter PFT- α zu einer signifikanten Zunahme der Infarktgröße an Mäuseherzen nach LAD-Ligatur. PFT- α wirkt dabei entscheidend auf die interstitiellen Zellen des Infarktgebietes, indem es die Replikationsrate dieser signifikant reduziert und zu einem instabilen Narbengewebe führt. Die Folge ist eine Zunahme der Herzrupturen, wobei es unter einer höheren PFT- α -Dosis (4,4 $\mu\text{g/g}$) sogar zu einer signifikant gesteigerten Letalitätsrate kommt.

Zwar führt die Gabe von PFT- α auch entsprechend der Hypothese zu einer Hemmung der Apoptose von Kardiomyozyten, dieses Phänomen führt jedoch nicht zu einer erkennbaren Verbesserung der Herzfunktion; Anhaltspunkte für eine Steigerung der Kardiomyozyten-Proliferation lassen sich unter PFT- α nicht finden.

Diese Ergebnisse sprechen im vorliegenden Modell der permanenten Koronarokklusion gegen eine kardioprotektive Rolle von Pifithrin- α .

In den letzten Jahren kam es zu einer Weiterentwicklung der synthetischen p53-Hemmer. *Zhu et al.* beschrieben 14 neue Substanzen, die durch Austausch einzelner Atome der Molekularstruktur nur geringe Unterschiede zu PFT- α aufwiesen und in ihrer Wirkung als noch potenter beschrieben wurden [183]. Zusätzlich wurde die Substanz **PFT- μ** isoliert [184]. Das kleine Molekül hemmt spezifisch die Bindung von p53 am Mitochondrium durch Reduktion seiner Affinität zu den anti-apoptischen Proteinen Bcl-XL und Bcl-2, hat aber gleichzeitig keinen Einfluss auf die Transkriptionsaktivität von p53. Ein genauere Untersuchung der Wirkungen und Funktionen dieser neuen Substanzen nach MI und ein Vergleich zu PFT- α stellt eine Herausforderung für die nächsten Jahre dar.

Das Interesse zukünftiger Studien sollte jedoch insbesondere auf der genaueren Untersuchung des instabilen Ersatzgewebes der Infarktnarbe, insbesondere in der Betrachtung der Nicht-Kardiomyozyten und ihrer Beeinflussung durch PFT- α , liegen.

In weiterführenden Experimenten unserer Arbeitsgruppe [185] zu diesem Thema wurde zwischenzeitlich auch der Einfluss von PFT- α auf die Kollagenstruktur des Infarktgebietes in dem vorgestellten Mausmodell näher betrachtet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es unter Pifithrin- α zu einer signifikant reduzierten Kollagendeposition kommt, so dass neben den zellulären Bestandteilen des Narbengewebes auch die extrazelluläre Matrix nachhaltig beeinflusst wird. Bei der Untersuchung verschiedener Matrixmetalloproteinasen (MMP) – es handelt sich hierbei um eine Klasse von Proteinase, von denen mehr als 20 Mitglieder bekannt sind und deren Funktion in dem Abbau verschiedener Strukturen der extrazellulären Matrix liegt [169] – konnte eine erhöhte MMP-2-Aktivität im Infarktgebiet unter PFT- α nachgewiesen werden [185]. Dieser Effekt stellte sich als p53-abhängig heraus, was zu der Hypothese führte, dass PFT- α p53-abhängig die MMP-2-Aktivität verstärkt, was eine instabile Infarktnarbe zur Folge hat, die letztendlich einen wesentlichen Anteil an der Entstehung der vermehrten Infarktexpansion und der gehäuften Ventrikelrupturen hat.

In der vorliegenden Arbeit wurden an einem in-vivo-Mausmodell zum ersten Mal die Auswirkungen des p53-Hemmers Pifithrin- α bei einer Gabe über eine Woche nach einem akuten Herzinfarkt bei permanenter Koronarakklusion untersucht. Im Gegensatz zu anderen Studien konnten hierbei keine kardioprotektiven Funktionen der Substanz beobachtet werden, so dass die Anwendung von Pifithrin- α in der frühen Remodelingphase nach einem MI nicht angebracht erscheint.

6 Zusammenfassung

Diese Arbeit untersucht in einer in-vivo-Studie den Einfluss des p53-Hemmers Pifithrin- α auf die Herzfunktion von Mäusen nach Myokardinfarkt. Die Tiere erhalten zu Beginn der Experimente mittels einer offenen Operation eine LAD-Ligatur, und Pifithrin- α (2,2 $\mu\text{g/g}$ oder 4,4 $\mu\text{g/g}$) oder die Kontroll-Substanz DMSO werden über 6 Tage intraperitoneal verabreicht. Während dieses Zeitfensters wird das Überleben der Versuchstiere dokumentiert, am siebten postoperativen Tag erfolgen zum Vergleich der Herzfunktion eine transthorakale Echokardiographie und im Anschluss die Tötung der Tiere und die Organisolierung. Neben den morphometrischen Parametern der isolierten Organe werden histologisch die Wanddicken und Infarktgrößen des linken Ventrikels bestimmt. Ergänzend dienen immunhistochemische Untersuchungsmethoden der Messung von Replikations- und Apoptoseraten der Kardiomyozyten im Randgebiet des Infarktes und im infarktfern gelegenen Septum interventriculare. Zusätzlich wird der Einfluss von Pifithrin- α auf die interstitiellen Zellen des Narbengewebes untersucht. Zuletzt werden mittels der quantitativen real time-PCR die Expressionsmuster der Apoptose-assoziierten Gene Bax, Apaf-1 und Caspase 6 und der Zellzyklus-assoziierten Gene Cyclin A, B2 und D2 betrachtet.

Die LAD-Ligatur der Versuchsmäuse führt zu großen anterio-apikalen Herzinfarkten, welche unter der Injektion von Pifithrin- α signifikant in ihrer Ausdehnung zunehmen. Es kommt zu einer signifikant erhöhten Letalitätsrate unter Anwendung der hohen PFT- α -Dosis (4,4 $\mu\text{g/g}$) in der ersten Woche nach dem Infarkt ereignis. Die Ursache für das frühzeitige Versterben nach MI kann auf Herzrupturen zurückgeführt werden. Immunhistochemisch zeigt sich im Randgebiet des Infarktes der Versuchstiere eine gegenüber dem Septum interventriculare signifikant gesteigerte Apoptoserate der KM, welche durch PFT- α signifikant reduziert wird. Während der Zellzyklus der KM nicht von Pifithrin- α beeinflusst wird, unterliegen die interstitiellen Zellen der sich ausbildenden Infarktnarbe einer gesteigerten Zellzyklusaktivität, die durch PFT- α signifikant gehemmt wird. Dadurch kommt es unter Pifithrin- α zu einer geringeren Gesamtzellzahl im Infarktgebiet, was vermutlich in dem Aufbau eines instabileren Ersatzgewebes resultiert und eine Ursache für die vergrößerten Infarkte und die dadurch erhöhte Letalität durch Herzrupturen unter dieser Substanz darstellt. Somit ist die Anwendung von Pifithrin- α in der frühen Remodelingphase nach einem MI nicht zu empfehlen.

7 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden: Todesfälle 2011 leicht rückläufig – häufigste Todesursache Herz-/Kreislaufkrankungen.
<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Aktuell.html> (abgerufen am 16.01.2013)
2. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden: Todesursachen.
<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html> (abgerufen am 16.01.2013)
3. U.-N. Riede, M. Werner, H.-E. Schäfer: Allgemeine und spezielle Pathologie. Thieme, Stuttgart, 2004, 5. Aufl., S. 468-75.
4. Hamm CW (2004) Leitlinien: Akutes Koronarsyndrom (ACS), Teil 2: Akutes Koronarsyndrom mit ST-Hebung. *Z Kardiol* 93(4):324-341.
5. W. Siegenthaler, H. E. Blum: Klinische Pathophysiologie. Thieme, Stuttgart - New York, 2006, 9. Aufl., S. 620-7.
6. Hamm CW (2004) Leitlinien: Akutes Koronarsyndrom (ACS), Teil 1: ACS ohne persistierende ST-Hebung. *Z Kardiol* 93(1):72-90.
7. Thygesen K, Alpert JS, White HD; Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction, Jaffe AS, Apple FS, Galvani M, Katus HA, Newby LK, Ravkilde J, Chaitman B, Clemmensen PM, Dellborg M, Hod H, Porela P, Underwood R, Bax JJ, Beller GA, Bonow R, Van der Wall EE, Bassand JP, Wijns W, Ferguson TB, Steg PG, Uretsky BF, Williams DO, Armstrong PW, Antman EM, Fox KA, Hamm CW, Ohman EM, Simoons ML, Poole-Wilson PA, Gurfinkel EP, Lopez-Sendon JL, Pais P, Mendis S, Zhu JR, Wallentin LC, Fernández-Avilés F, Fox KM, Parkhomenko AN, Priori SG, Tendera M, Voipio-Pulkki LM, Vahanian A, Camm AJ, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hellemans I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano JL, Morais J, Brener S, Harrington R, Morrow D, Lim M, Martinez-Rios MA, Steinhubl S, Levine GN, Gibler WB, Goff D, Tubaro M, Dudek D, Al-Attar N (2007) Universal definition of myocardial infarction. *Circulation* 116(22):2634-53.
8. Fox KAA, Steg PG, Eagle KA, Goodman SG, Anderson FA, Granger CB, Flather MD, Budaj A, Quill A, Gore JM (2007) Decline in rates of death and heart failure in acute coronary syndromes, 1999-2006. *J Am Med Assoc* 297(17):1892-1900.
9. Statistisches Bundesamt, Zweigstelle Bonn: Diagnosedaten der Krankenhäuser ab 2000 (Fälle/Sterbefälle, Berechnungs- und Belegungstage, durchschnittliche Verweildauer). Gliederungsmerkmale: Jahre, Behandlungsort, Alter, Geschlecht, Verweildauer, ICD10. Stand: 17.12.2013. *http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_new/&p_ai_d=i&p_aid=29910018&nummer=544&p_sprache=D&p_indsp=-&p_aid=58738200* (abgerufen am 20.05.2014)
10. Statistisches Bundesamt, Zweigstelle Bonn: Krankheitskosten in Mio. € für Deutschland. Gliederungsmerkmale: Jahre, Geschlecht, ICD10, Einrichtung. Stand: 11.08.2010. *http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_new/&p_ai_d=i&p_aid=29910018&nummer=554&p_sprache=D&p_indsp=-&p_aid=60099142* (abgerufen am 16.01.2013)
11. Heather Arruda: Research milestones. Stand: 10.12.2012.
<http://www.framinghamheartstudy.org/about/milestones.html> (abgerufen am 16.01.2013)
12. Kuulasmaa K, Tunstall-Pedoe H, Dobson A, Fortmann S, Sans S, Tolonen H, Evans A, Ferrario M, Tuomilehto J (2000) Estimation of contribution of changes in classic risk

- factors to trends in coronary-event rates across the WHO MONICA Project populations. *Lancet* 355(9205):675-87.
13. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L; INTERHEART Study Investigators (2004) Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 364(9438):937-52.
 14. Ross R, Glomset JA (1973) Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 180(4093):1332-9.
 15. Ross R, Glomset J, Harker L (1977) Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol* 86(3):675-84.
 16. Ross R (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362(6423):801-9.
 17. Crowther MA (2005) Pathogenesis of atherosclerosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* (-):436-41.
 18. W. Böcker, H. Denk, P. U. Heitz: Pathologie. Urban und Fischer, München - Jena, 2004, 3. Aufl., S. 462-9.
 19. St John Sutton MG, Sharpe N (2000) Left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 101(-):2981-8.
 20. Pfeffer MA, Braunwald E (1990) Ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 81(4):1161-1172.
 21. Yousef ZR, Redwood SR, Marber MS (2000) Postinfarction left ventricular remodelling: where are the theories and trials leading us? *Heart* 83(1):76-80.
 22. Sun Y (2009) Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovasc Res* 81(3):482-90.
 23. Jhund PS, McMurray JJV (2008) Heart failure after acute myocardial infarction - A lost battle in the war on heart failure? *Circulation* 118(20):2019-21.
 24. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E (1979) Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 44(4):503-12.
 25. Chareonthaitawee P, Christian TF, Hirose K, Gibbons RJ, Rumberger JA (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.
 26. White HD, Norris RM, Brown MA, Brandt PW, Whitlock RM, Wild CJ (1987) Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation* 76(1):44-51.
 27. Bicknell KA, Coxon CH, Brooks G (2007) Can the cardiomyocyte cell cycle be reprogrammed? *J Mol Cell Cardiol* 42(4):706-21.
 28. Malumbres M, Barbacid M (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9(3):153-66.
 29. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P (2001) Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 344(23):1750-7.
 30. Jianming Qiu: Cell cycle. Stand: 02.01.2012. <http://www.hixonparvo.info/cellcycle.jpg> (abgerufen am 16.01.2013)
 31. Ahuja P, Sdek P, MacLellan WR (2007) Cardiomyocyte cell cycle control in development, disease and regeneration. *Physiol Rev* 87(2):521-44.
 32. Pasumarthi KB, Field LJ (2002) Cardiomyocyte cell cycle regulation. *Circ Res* 90(10):1044-54.
 33. Soonpa MH, Field LJ (1997) Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts. *Am J Physiol* 272(1 Pt 2):220-6.
 34. Anversa P, Kajstura J (1998) Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res* 83(1):1-14.
 35. Soonpaa MH, Field LJ (1998) Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ Res* 83(1):15-26.

36. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD (2003) Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(21):12313-8.
37. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P (2003) Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114(6):763-76.
38. Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, Evans S (2003) Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell* 5(6):877-89.
39. Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, Hawke TJ, Richardson JA, Bates S, Goetsch SC, Gallardo TD, Garry DJ (2004) Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol* 165(1):262-75.
40. Pasumarthi KB, Nakajima H, Nakajima HO, Soonpaa MH, Field LJ (2005) Targeted expression of Cyclin D2 results in cardiomyocyte DNA synthesis and infarct regression in transgenic mice. *Circ Res* 96(1):110-8.
41. Lafontant PJ, Field LJ (2006) The cardiomyocyte cell cycle. *Novartis Found Symp* 274(-):196-276.
42. Borchardt T, Braun T (2007) Cardiovascular regeneration in non-mammalian model systems: What are the differences between newts and man? *Thromb Haemost* 98(2):311-8.
43. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4):239-57.
44. Majno G, Joris I (1995) Apoptosis, Oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146(1):3-15.
45. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE (2009) Cell death. *N Engl J Med* 361(16):1570-83.
46. Melino G, Knight RA, Green DR (2001) Publications in cell death: the golden age. *Cell Death Differ* 8(1):1-3.
47. Glücksmann A (1951) Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev Camb Philos Soc* 26(1):59-86.
48. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter: *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH, Weinheim, 2004, 4. Aufl., S. 1174-8.
49. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death 2009 (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16(1):3-11.
50. Sulston JE, Horvitz HR (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56(1):110-56.
51. Horvitz HR, Sternberg PW, Greenwald IS, Fixsen W, Ellis HM (1983) Mutations that affect neural cell lineages and cell fates during the development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 48(Pt 2):453-63.
52. Takemura G, Fujiwara H (2004) Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction. *Pharmacol Ther* 104(1):1-16.
53. Lee Y, Gustafsson AB (2009) Role of apoptosis in cardiovascular disease. *Apoptosis* 14(4):536-48.
54. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonising IAP proteins. *Cell* 102(1):42-53.
55. van Empel VP, Bertrand AT, Hofstra L, Crijns HJ, Doevendans PA, De Windt LJ (2005) Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovasc Res* 67(1):21-9.

56. Shaw J, Kirshenbaum LA (2008) Molecular regulation of autophagy and apoptosis during ischemic and non-ischemic cardiomyopathy. *Autophagy* 4(4):427-34.
57. Hockenbery D, Nuñez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348(6299):334-5.
58. Antonsson B (2001) Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res* 306(3):347-61.
59. Youle RJ, Strasser A (2008) The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(1):47-59.
60. Chipuk JE, Green DR (2008) How do Bcl-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* 18(4):157-64.
61. Gustafsson AB, Gottlieb RA (2003) Mechanisms of apoptosis in the heart. *J Clin Immunol* 23(6):447-59.
62. Alnemri ES (1997) Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem* 64(1):33-42.
63. Li J, Yuan J (2008) Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27(48):6194-206.
64. Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407(6805):770-6.
65. Lüthi AU, Martin SJ (2007) The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ* 14(4):641-50.
66. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68(2):251-306.
67. Sakahira H, Enari M, Nagata S (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391(6662):96-9.
68. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403(6765):98-103.
69. Rasheva VI, Domingos PM (2009) Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 14(8):996-1007.
70. Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, Manabe T, Yamagishi S, Bando Y, Imaizumi K, Tsujimoto Y, Tohyama M (2004) Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and A β -induced cell death. *J Cell Biol* 165(3):347-56.
71. Thuerauf DJ, Marcinko M, Gude N, Rubio M, Sussman MA, Glembotski CC (2006) Activation of the unfolded protein response in infarcted mouse heart and hypoxic cultured cardiac myocytes. *Circ Res* 99(3):275-82.
72. Szegezdi E, Duffy A, O'Mahoney ME, Logue SE, Mylotte LA, O'Brien T, Samali A (2006) ER stress contributes to ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 349(4):1406-11.
73. Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC (2003) Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 22(53):8608-18.
74. Bajaj G, Sharma RK (2006) TNF-alpha-mediated cardiomyocyte apoptosis involves caspase-12 and calpain. *Biochem Biophys Res Commun* 345(4):1558-64.
75. Ruwanpura SM, McLachlan RI, Meachem SJ (2010) Hormonal regulation of male germ cell development. *J Endocrinol* 205(2):117-31.
76. Gottlieb RA, Burlison KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL (1994) Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 94(4):1621-8.
77. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P (1996) Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 74(1):86-107.
78. Fliss H, Gattlinger D (1996) Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res* 79(5):949-56.
79. Olivetti G, Quaini F, Sala R, Lagrasta C, Corradi D, Bonacina E, Gambert SR, Cigola E, Anversa P (1996) Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *J Mol Cell Cardiol* 28(9):2005-16.

80. Veinot JP, Gattinger DA, Fliss H (1997) Early apoptosis in human myocardial infarcts. *Hum Pathol* 28(4):485-92.
81. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM (1997) Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 95(2):320-3.
82. Anversa P, Cheng W, Liu Y, Leri A, Redaelli G, Kajstura J (1998) Apoptosis and myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 93(Suppl 3):8-12.
83. Cheng W, Kajstura J, Nitahara JA, Li B, Reiss K, Liu Y, Clark WA, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P (1996) Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. *Exp Cell Res* 226(2):316-27.
84. Hayakawa K, Takemura G, Koda M, Kawase Y, Maruyama R, Li Y, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H (2002) Sensitivity to apoptosis signal, clearance rate, and ultrastructure of fas ligand-induced apoptosis in vivo adult cardiac cells. *Circulation* 105(25):3039-45.
85. Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y (2000) Apoptosis in relevant clinical situations: contribution of apoptosis in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 45(3):630-41.
86. Takemura G, Ohno M, Hayakawa Y, Misao J, Kanoh M, Ohno A, Uno Y, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H (1998) Role of apoptosis in the disappearance of infiltrated and proliferated interstitial cells after myocardial infarction. *Circ Res* 82(11):1130-8.
87. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991) P53 mutations in human cancers. *Science* 253(5015):49-53.
88. Fridman JS, Lowe SW (2003) Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22(56):9030-40.
89. Lane DP, Crawford LV (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278(5701):261-3.
90. Linzer DI, Levine AJ (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17(1):43-52.
91. Lane DP, Crawford LV (1992) p53, guardian of the genome. *Nature* 358(6381):15-6.
92. Wang L, Wu Q, Qiu P, Mirza A, McGuirk M, Kirschmeier P, Greene JR, Wang Y, Pickett CB, Liu S (2001) Analyses of p53 target genes in the human genome by bioinformatic and microarray approaches. *J Biol Chem* 276(47):43604-10.
93. Levine AJ, Hu W, Feng Z (2006) The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ* 13(6):1027-36.
94. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M (1991) Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352(6333):345-7.
95. Krijnen PA, Nijmeijer R, Meijer CJ, Visser CA, Hack CE, Niessen HW (2002) Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction. *J Clin Pathol* 55(11):801-11.
96. Pietsch EC, Sykes SM, McMahan SB, Murphy ME (2008) The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* 27(50):6507-21.
97. Caelles C, Helmberg A, Karin M (1994) p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 370(6486):220-3.
98. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11(3):577-90.
99. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303(5660):1010-4.
100. Taylor WR, Stark GR (2001) Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20(15):1803-15.
101. Hassink RJ, de la Riviere AB, Mummery CL, Doevendans PA (2003) Transplantation of cells for cardiac repair. *J Am Coll Cardiol* 41(5):711-7.
102. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001) Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18):10344-9.

103. Boyle AJ, Schulman SP, Hare JM, Oettgen P (2006) Stem cell therapy for cardiac repair. Ready for the next step. *Circulation* 114(4):339-52.
104. Liu Y, Kitsis RN (1996) Induction of DNA synthesis and apoptosis in cardiac myocytes by E1A oncoprotein. *J Cell Biol* 133(2):325-34.
105. Katz EB, Steinhilber ME, Delcarpio JB, Daud AI, Claycomb WC, Field LJ (1992) Cardiomyocyte proliferation in mice expressing alpha-cardiac myosin heavy chain-SV40 T-antigen transgenes. *Am J Physiol* 262(6 Pt 2):H1867-76.
106. Daud AI, Lanson NA Jr, Claycomb WC, Field LJ (1993) Identification of SV40 large T-antigen-associated proteins in cardiomyocytes from transgenic mice. *Am J Physiol* 264(5 Pt 2):1693-700.
107. Huh NE, Pasumarthi KB, Soonpa MH, Jing S, Patton B, Field LJ (2001) Functional abrogation of p53 is required for T-Ag induced proliferation in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 33(8):1405-19.
108. Nakajima H, Nakajima HO, Tsai SC, Field LJ (2004) Expression of mutant p193 and p53 permits cardiomyocyte cell cycle reentry after myocardial infarction in transgenic mice. *Circ Res* 94(12):1606-14.
109. Reiss K, Cheng W, Ferber A, Kajstura J, Li P, Li B, Olivetti G, Homcy CJ, Baserga R, Anversa P (1996) Overexpression of insulin-like growth factor-1 in the heart is coupled with myocyte proliferation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci* 93(16):8630-35.
110. Engel FB, Schebesta M, Duong MT, Lu G, Ren S, Madwed JB, Jiang H, Wang Y, Keating MT (2005) P38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev* 19(10):1175-87.
111. Hassink RJ, Pasumarthi KB, Nakajima H, Rubart M, Soonpaa MH, de la Rivière AB, Doevendans PA, Field LJ (2008) Cardiomyocyte cell cycle activation improves cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 78(1):18-25.
112. Green DR, Kroemer G (2005) Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight? *J Clin Invest* 115(10):2610-7.
113. Ekert PG, Silke J, Vaux DL (1999) Caspase inhibitors. *Cell Death Differ* 6(11):1081-86.
114. Ray CA, Black RA, Kronheim SR, Greenstreet TA, Sleath PR, Salvesen GS, Pickup DJ (1992) Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 69(4):597-604.
115. Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y (1998) Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 97(3):276-81.
116. Hayakawa K, Takemura G, Kanoh M, Li Y, Koda M, Kawase Y, Maruyama R, Okada H, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H (2003) Inhibition of granulation tissue cell apoptosis during the subacute stage of myocardial infarction improves cardiac remodeling and dysfunction at the chronic stage. *Circulation* 108(1):104-9.
117. Holly TA, Drincic A, Byun Y, Nakamura S, Harris K, Klocke FJ, Cryns VL (1999) Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 31(9):1709-15.
118. Mocanu MM, Baxter GF, Yellon DM (2000) Caspase inhibition and limitation of myocardial infarct size: protection against lethal reperfusion injury. *Br J Pharmacol* 130(2):197-200.
119. Okamura T, Miura T, Takemura G, Fujiwara H, Iwamoto H, Kawamura S, Kimura M, Ikeda Y, Iwatate M, Matsuzaki M (2000) Effect of caspase inhibitors on myocardial infarct size and myocyte DNA fragmentation in the ischemia-reperfused rat heart. *Cardiovasc Res* 45(3):642-50.
120. Hausenloy DJ, Yellon DM (2009) Cardioprotective growth factors. *Cardiovasc Res* 83(2):179-94.
121. Li Q, Li B, Wang X, Leri A, Jana KP, 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.

122. Bujak M, Frangogiannis NG (2007) The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res* 74(2):184-95.
123. Lefer AM, Tsao P, Aoki N, Palladino Jr MA (1990) Mediation of cardioprotection by transforming growth factor-beta. *Science* 249(4964):61-4.
124. Buerke M, Murohara T, Skurk C, Nuss C, Tomaselli K, Lefer AM (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.
125. Chen Z, Chua CC, Ho YS, Hamdy RC, Chua BH (2001) Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280(5):2313-20.
126. Tanaka M, Nakae S, Terry RD, Mokhtari GK, Gunawan F, Balsam LB, Kaneda H, Kofidis T, Tsao PS, Robbins RC (2004) Cardiomyocyte-specific Bcl-2 overexpression attenuates ischemia-reperfusion injury, immune response during acute rejection, and graft coronary artery disease. *Blood* 104(12):3789-96.
127. Oskarsson HJ, Coppey L, Weiss RM, Li WG (2000) Antioxidants attenuate myocyte apoptosis in the remote non-infarcted myocardium following large myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 45(3):679-87.
128. Riksen NP, Hausenloy DJ, Yellon DM (2008) Erythropoietin: ready for prime-time cardioprotection. *Trends Pharmacol Sci* 29(5):258-67.
129. Jäättelä M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M (1998) Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J* 17(21):6124-34.
130. Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV, Gudkov AV (1999) A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* 285(5434):1733-7.
131. Walton MI, Wilson SC, Hardcastle IR, Mirza AR, Workman P (2005) An evaluation of the ability of pifithrin- α and - β to inhibit p53 function in two wild-type p53 human tumor cell lines. *Mol Cancer Ther* 4(9):1369-77.
132. Komarova EA, Gudkov AV (2001) Chemoprotection from p53-dependent apoptosis: potential clinical applications of the p53 inhibitors. *Biochem Pharmacol* 62(6):657-67.
133. Culmsee C, Zhu X, Yu QS, Chan SL, Camandola S, Guo Z, Greig NH, Mattson MP (2001) A synthetic inhibitor of p53 protects neurons against death induced by ischemic and excitotoxic insults, and amyloid beta-peptide. *J Neurochem* 77(1):220-8.
134. Duan W, Zhu X, Ladenheim B, Yu QS, Guo Z, Oyler J, Cutler RG, Cadet JL, Greig NH, Mattson MP (2002) p53 inhibitors preserve dopamine neurons and motor function in experimental parkinsonism. *Ann Neurol* 52(5):597-606.
135. Leker RR, Aharonowiz M, Greig NH, Ovidia H (2004) The role of p53-induced apoptosis in cerebral ischemia: effects of the p53 inhibitor pifithrin alpha. *Exp Neurol* 187(2):478-86.
136. Yan JH, Yang XM, Chen CH, Hu Q, Zhao J, Shi XZ, Luan LJ, Yang L, Qin LH, Zhou CM (2008) Pifithrin-alpha reduces cerebral vasospasm by attenuating apoptosis of endothelial cells in a subarachnoid haemorrhage model of rat. *Chin Med J (Engl)* 121(5):414-9.
137. Begum RA, Farah IO, Ishaque AB (2002) Pifithrin-alpha (PFT-alpha) caused differential protection of rat liver cells and HepG2 cell line in response to the selective cytotoxicity of arsenic and cadmium. *Biomed Sci Instrum* 38:41-6.
138. Kelly KJ, Plotkin Z, Vulgamott SL, Dagher PC (2003) P53 mediates the apoptotic response to GTP depletion after renal ischemia-reperfusion: protective role of a p53 inhibitor. *J Am Soc Nephrol* 14(1):128-38.
139. Schäfer T, Scheuer C, Roemer K, Menger MD, Vollmar B (2003) Inhibition of p53 protects liver tissue against endotoxin-induced apoptotic and necrotic cell death. *FASEB J* 17(6):660-7.
140. Farah IO, Begum RA, Ishaque AB (2007) Differential protection and transactivation of P53, P21, Bcl2, PCNA, cyclin G, and MDM2 genes in rat liver and the HepG2 cell line upon exposure to pifithrin. *Biomed Sci Instrum* 43:116-21.

141. Vollmar B, El-Gibaly AM, Scheuer C, Strik MW, Bruch HP, Menger MD (2002) Acceleration of cutaneous wound healing by transient p53 inhibition. *Lab Invest* 82(8):1063-71.
142. Marsolais D, Côté CH, Frenette J (2007) Pifithrin-alpha, an inhibitor of p53 transactivation, alters the inflammatory process and delays tendon healing following acute injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292(1):321-7.
143. Liu P, Xu B, Cavalieri TA, Hock CE (2008) Inhibition of p53 by pifithrin-alpha reduces myocyte apoptosis and leukocyte transmigration in aged rat hearts following 24 hours of reperfusion. *Shock* 30(5):545-51.
144. Liu X, Chua CC, Gao J, Chen Z, Landy CL, Hamdy R, Chua BH (2004) Pifithrin-alpha protects against doxorubicin-induced apoptosis and acute cardiotoxicity in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(3):933-9.
145. Liu P, Xu B, Cavalieri TA, Hock CE (2006) Pifithrin-alpha attenuates p53-mediated apoptosis and improves cardiac function in response to myocardial ischemia/reperfusion in aged rats. *Shock* 26(6):608-14.
146. Gudkov AV, Komarova EA (2005) Prospective therapeutic applications of p53 inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 331(3):726-36.
147. Sohn D, Graupner V, Neise D, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Jänicke RU (2009) Pifithrin-alpha protects against DNA damage-induced apoptosis downstream of mitochondria independent of p53. *Cell Death Differ* 16(6):869-78.
148. Komarova EA, Neznanov N, Komarov PG, Chernov MV, Wang K, Gudkov AV (2003) p53 inhibitor pifithrin alpha can suppress heat shock and glucocorticoid signaling pathways. *J Biol Chem* 278(18):15465-8.
149. Lorenzo E, Ruiz-Ruiz C, Quesada AJ, Hernández G, Rodríguez A, López-Rivas A, Redondo JM (2002) Doxorubicin induces apoptosis and CD95 gene expression in human primary endothelial cells through a p53-dependent mechanism. *J Biol Chem* 277(17):10883-92.
150. Lutgens E, Daemen MJ, de Muinck ED, Debets J, Leenders P, Smits JF (1999) Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes. *Cardiovasc Res* 41(3):586-93.
151. 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.
152. Ebel H, Jungblut M, Zhang Y, Kubin T, Kostin S, Technau A, Oustanina S, Niebrügge 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.
153. Mike de Kievith, Belgien: Malvorlage Herz. <http://www.schulbilder.org/malvorlage-herz-i9486.html> (abgerufen am 16.01.2013)
154. Sigma-Aldrich Co.: Product Information. Stand: 2013. http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/b5002pis.Par.0001.File.tmp/b5002pis.pdf (abgerufen am 16.01.2013)
155. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156-9.
156. Chomczynski P, Sacchi N (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 1(2):581-5.
157. Bialik S, Geenen DL, Sasson IE, Cheng R, Horner JW, Evans SM, Lord EM, Koch CJ, Kitsis RN (1997) Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53. *J Clin Invest* 100(6):1363-72.
158. Patten RD, Aronovitz MJ, Deras-Mejia L, Pandian NG, Hanak GG, Smith JJ, Mendelsohn ME, Konstam MA (1998) Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *Am J Physiol* 274(5 Pt 2):1812-20.

159. Degabriele NM, Griesenbach U, Sato K, Post MJ, Zhu J, Williams J, Jeffery PK, Geddes DM, Alton EW (2004) Critical appraisal of the mouse model of myocardial infarction. *Exp Physiol* 89(4):497-505.
160. Mocanu MM, Yellon DM (2003) p53 down-regulation: a new molecular mechanism involved in ischaemic preconditioning. *FEBS Lett* 555(2):302-6.
161. Chua CC, Liu X, Gao J, Hamdy RC, Chua BH (2006) Multiple actions of pifithrin-alpha on doxorubicin-induced apoptosis in rat myoblastic H9c2 cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290(6):2606-13.
162. Hayashidani S, Tsutsui H, Ikeuchi M, Shiomi T, Matsusaka H, Kubota T, Imanaka-Yoshida K, Itoh T, Takeshita A (2003) Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285(3):1229-35.
163. Fang L, Gao XM, Samuel CS, Su Y, Lim YL, Dart AM, Du XJ (2008) Higher levels of collagen and facilitated healing protect against ventricular rupture following myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)* 115(3):99-106.
164. Matsumura S, Iwanaga S, Mochizuki S, Okamoto H, Ogawa S, Okada Y (2005) Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *J Clin Invest* 115(3):599-609.
165. Honan MB, Harrell FE Jr, Reimer KA, Califf RM, Mark DB, Pryor DB, Hlatky MA (1990) Cardiac rupture, mortality and the timing of thrombolytic therapy: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 16(2):359-67.
166. Matsusaka H, Ide T, Matsushima S, Ikeuchi M, Kubota T, Sunagawa K, Kinugawa S, Tsutsui H (2006) Targeted deletion of p53 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res* 70(3):457-65.
167. Kumar D, Hacker TA, Buck J, Whitesell LF, Kaji EH, Douglas PS, Kamp TJ (2005) Distinct mouse coronary anatomy and myocardial infarction consequent to ligation. *Coron Artery Dis* 16(1):41-4.
168. Bayat H, Swaney JS, Ander AN, Dalton N, Kennedy BP, Hammond HK, Roth DM (2002) Progressive heart failure after myocardial infarction in mice. *Basic Res Cardiol* 97(3):206-13.
169. Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ (2001) Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res* 89(3):201-10.
170. Orn S, Manhenke C, Anand IS, Squire I, Nagel E, Edvardsen T, Dickstein K (2007) Effect of left ventricular scar size, location, and transmural extent on left ventricular remodeling with healed myocardial infarction. *Am J Cardiol* 99(8):1109-14.
171. Michael LH, Ballantyne CM, Zachariah JP, Gould KE, Pocius JS, Taffet GE, Hartley CJ, Pham TT, Daniel SL, Funk E, Entman ML (1999) Myocardial infarction and remodeling in mice: effect of reperfusion. *Am J Physiol* 277(2 Pt 2):660-8.
172. Condorelli G, Roncarati R, Ross J Jr, Pisani A, Stassi G, Todaro M, Trocha S, Drusco A, Gu Y, Russo MA, Frati G, Jones SP, Lefer DJ, Napoli C, Croce CM (2001) Heart-targeted overexpression of caspase3 in mice increases infarct size and depresses cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17):9977-82.
173. Rothermel BA, Hill JA (2008) Autophagy in load-induced heart disease. *Circ Res* 103(12):1363-9.
174. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102(1):33-42.
175. Wu Y, Xing D, Liu L, Gao B (2008) Regulation of Bax activation and apoptotic response to UV irradiation by p53 transcription-dependent and -independent pathways. *Cancer Lett* 271(2):231-9.
176. Nicholson DW (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6(11):1028-42.
177. Robles AI, Bemmels NA, Foraker AB, Harris CC (2001) APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Res* 61(18):6660-4.

178. MacLachlan TK, El-Deiry WS (2002) Apoptotic threshold is lowered by p53 transactivation of caspase-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(14):9492-7.
179. Kannan K, Kaminski N, Rechavi G, Jakob-Hirsch J, Amariglio N, Givol D (2001) DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1. *Oncogene* 20(26):3449-55.
180. Ferraro E, Pesaresi MG, De Zio D, Cencioni MT, Gortat A, Cozzolino M, Berghella L, Salvatore AM, Oettinghaus B, Scorrano L, Pérez-Payà E, Cecconi F (2011) Apaf1 plays a pro-survival role by regulating centrosome morphology and function. *J Cell Sci* 124(Pt 20):3450-63.
181. Cecconi F (1999) Apaf1 and the apoptotic machinery. *Cell Death Differ* 6(11):1087-98.
182. Takatani T, Takahashi K, Uozumi Y, Shikata E, Yamamoto Y, Ito T, Matsuda T, Schaffer SW, Fujio Y, Azuma J (2004) Taurine inhibits apoptosis by preventing formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 287(4):C949-53.
183. Zhu X, Yu QS, Cutler RG, Culmsee CW, Holloway HW, Lahiri DK, Mattson MP, Greig NH (2002) Novel p53 inactivators with neuroprotective action: syntheses and pharmacological evaluation of 2-imino-2,3,4,5,6,7-hexahydrobenzothiazole and 2-imino-2,3,4,5,6,7-hexahydrobenzoxazole derivatives. *J Med Chem* 45(23):5090-7.
184. Strom E, Sathe S, Komarov PG, Chernova OB, Pavlovska I, Shyshynova I, Bosykh DA, Burdelya LG, Macklis RM, Skaliter R, Komarova EA, Gudkov AV (2006) Small-molecule inhibitor of p53 binding to mitochondria protects mice from gamma radiation. *Nat Chem Biol* 2(9):474-9.
185. Zhang Y, Köhler K, Xu J, Lu D, Braun T, Schlitt A, Buerke M, Müller-Werdan U, Werdan K, Ebel H (2011) Inhibition of p53 after acute myocardial infarction: reduction of apoptosis is counteracted by disturbed scar formation and cardiac rupture. *J Mol Cell Cardiol* 50(3):471-8.

8 Thesen

- 1) Eine proximale LAD-Ligatur führt an Mäuseherzen zu großen anterio-apikalen Infarkten, das interventrikuläre Septum der Mäuseherzen ist dagegen kaum von der Ischämie betroffen (LAD = *left anterior descending coronary artery*, Hauptast der linken Koronararterie).
- 2) Etwa 40 % der Versuchsmäuse der Kontrollgruppe sterben in der ersten Woche nach Myokardinfarkt (MI), was bevorzugt in den ersten drei Tagen nach dem Infarkt ereignis – also in der frühen Phase des Remodelings – stattfindet.
- 3) Die mit einer höheren Pifithrin (PFT)- α -Dosis (4,4 $\mu\text{g/g}$) behandelten Versuchstiere sterben alle in der ersten Woche nach MI. Sie haben eine signifikant erhöhte Letalität gegenüber den Kontrolltieren ($p < 0,01$) und gegenüber den mit einer geringeren PFT- α -Dosis (2,2 $\mu\text{g/g}$) behandelten Tieren ($p < 0,05$).
- 4) Die mit einer geringeren PFT- α -Dosis (2,2 $\mu\text{g/g}$) behandelten Tiere haben in der ersten Woche nach dem Infarkt ereignis ähnliche Überlebensraten wie die Kontrolltiere. PFT- α verändert in dieser Dosis jedoch den typischen zeitlichen Ablauf des Remodelings, so dass die Tiere dieser Behandlungsgruppe gleichmäßig über die gesamte Woche verteilt versterben.
- 5) Herzrupturen stellen die Haupttodesursache für das vorzeitige Ableben der Tiere aller Versuchsgruppen dar.
- 6) Im Rahmen des Remodelings kommt es bei allen Versuchsgruppen im Infarktgebiet zu einer Ausdünnung der Vorderwand des linken Ventrikels (LV), im Sinne einer Infarktprogression sind zu großen Anteilen auch Lateral- und Hinterwand mit betroffen, das Septum interventriculare ist nicht betroffen.
- 7) Unter der Gabe von PFT- α (2,2 $\mu\text{g/g}$) in der Postinfarktphase nimmt die Infarktgröße der Herzen von im Mittel $51 \pm 8 \%$ (der Kontrollgruppe) auf $62 \pm 7 \%$ signifikant zu ($p < 0,05$).
- 8) Die PFT- α -Gabe (2,2 $\mu\text{g/g}$) führt außerdem zu einer Verschlechterung der echokardiographisch bestimmten Herzfunktionsparameter: es kommt zu einem (gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikantem) Abfall der Ejektionsfraktion des linken Ventrikels um im Mittel 5 %.
- 9) Im Randgebiet des Infarktes kommt es bei allen Versuchsgruppen zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate der Kardiomyozyten (KM) im Vergleich zum infarktfernen Myokard (Kontrolle: $p < 0,001$, PFT- α 2,2 $\mu\text{g/g}$: $p < 0,05$), so dass die Apoptose in der frühen Postinfarktphase eine wesentliche Rolle beim Untergang der KM im Infarkt-randgebiet spielt.

- 10) Unter PFT- α (2,2 $\mu\text{g/g}$) unterliegen nur noch 0,02 % der KM im Randgebiet des Infarktes der Apoptose (Kontrolle: 0,05 %). Die Apoptose wird unter dieser PFT- α -Dosis signifikant gehemmt ($p < 0,05$).
- 11) Im Randgebiet des Infarktes kommt es bei allen Versuchsgruppen zu einer leicht gesteigerten (nicht signifikanten) DNA-Syntheserate der KM gegenüber der Rate im infarktfernen Myokard.
- 12) PFT- α (2,2 $\mu\text{g/g}$) hat keinen relevanten Einfluss auf die Zellzyklusaktivität der KM.
- 13) Unter PFT- α (2,2 $\mu\text{g/g}$) befinden sich signifikant weniger interstitielle Zellen in der Infarktnarbe ($p < 0,05$).
- 14) Die interstitiellen Zellen des Infarktgebietes unterliegen einer gesteigerten Zellzyklusaktivität, die durch PFT- α (2,2 $\mu\text{g/g}$) hoch signifikant gehemmt wird ($p < 0,001$). Als Folge der Pifithrin- α -Gabe bildet sich ein instabileres Ersatzgewebe mit einem geringeren Zellanteil.
- 15) Im Infarktgebiet der Kontroll- und PFT- α (2,2 $\mu\text{g/g}$)-Gruppe kommt es im Vergleich zum infarktfern gelegenen Myokard zu einer vermehrten Expression der Apoptose-assoziierten Gene Bax (Kontrolle: $p = 0,08$, PFT- α : $p = 0,05$) und Caspase 6 (Kontrolle: $p = 0,08$, PFT- α : $p < 0,05$), was eine gesteigerte Apoptose in diesem Gebiet zeigt.
- 16) PFT- α (2,2 $\mu\text{g/g}$) nimmt dabei keinen Einfluss auf die Expression der Apoptose-assoziierten Gene Bax, Caspase 6 und Apaf-1.
- 17) In beiden Versuchsgruppen werden im Infarktgebiet die Cycline A, B2 und D2 signifikant stärker exprimiert (für alle $p < 0,05$), was eine erhöhte Zellzyklusaktivität in diesem Gebiet zeigt.
- 18) Es kommt im Infarktgebiet zu einer tendenziellen Abnahme der Expressionslevel der Cycline A, B2 und D2 unter PFT- α (2,2 $\mu\text{g/g}$).
- 19) In Zusammenschau der eigenen Ergebnisse hat PFT- α nach MI bei permanenter Koronarokklusion keine kardioprotektive Rolle und ist daher zur Behandlung in der frühen Postinfarktperiode nicht zu empfehlen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Katharina Greye, geb. Köhler
Geburtstag, -ort: 21.01.1983, Halle (Saale)
Anschrift: Schlosserbreite 39, 85567 Grafing bei München
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Schulbildung

08/1989 – 07/1993 Paulus-Grundschule, Halle
08/1993 – 04/2002 Elisabeth-Gymnasium, Halle,
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Universitäre Ausbildung

10/2002 – 06/2009 Medizinstudium, Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg
08/2004 Physikum
seit 04/2007 Arbeit an Dissertation
06/2009 Ärztliche Prüfung
07/2009 Approbation als Ärztin
10/2009-03/2010 Promotionssemester MLU Halle-Wittenberg

Beruf

Seit 07/2010 Assistenzärztin in der Klinik für Neurologie und
neurologische Funktionsdiagnostik/-therapie,
Isar-Amper-Klinikum gemeinnützige GmbH
Klinikum München-Ost, Haar

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit in allen Teilen selbständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel verfasst habe. Ich erkläre ausdrücklich, dass ich sämtliche direkt oder indirekt übernommenen Daten aus fremden Quellen, auch aus dem Internet (einschließlich Tabellen, Grafiken) als solche kenntlich gemacht habe.

Ich versichere, dass niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten hat, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Halle (Saale), den 21.05.2014

Katharina Greye

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich versichere, dass von mir keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation erfolgt sind. Die Arbeit wurde weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle (Saale), den 21.05.2014

Katharina Greye

Danksagung

Die experimentelle Arbeit dieser Dissertation wurde an der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III und am Institut für Physikalische Chemie der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg durchgeführt. Daher möchte ich mich bei den Arbeitsgruppen beider Einrichtungen herzlich bedanken, die Arbeit im Team hat mir viel Freude bereitet.

Insbesondere gilt mein Dank Prof. Dr. med. Karl Werdan, Prof. Dr. med. habil. Ursula Müller-Werdan und PD Dr. med. habil. Henning Ebel für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit und der Bereitstellung der benötigten Ressourcen.

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an Dr. Ying Zhang richten. Er war stets ein freundlicher und geduldiger Ansprechpartner und Freund für mich und gab mir mit seinem fundierten Fachwissen und kreativen Ideen viele Anregungen für meine wissenschaftliche Arbeit.

Für das mir entgegengebrachte Vertrauen, die exzellente Betreuung und Beratung während des gesamten praktischen Abschnitts und bei der schriftlichen Niederlegung dieser Arbeit gilt ein besonderer Dank meinem Betreuer PD Dr. med. habil. Henning Ebel.

Ich möchte auch meinen Freunden und besonders meinem Ehemann danken, die mich stets bestärkt haben, wenn ich an mir gezweifelt habe und mir Kraft für alle Herausforderungen gaben.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, die in vielerlei Hinsicht die Grundsteine für meinen privaten und beruflichen Weg gelegt haben.