
Einfluss des Immunsystems und der endothelialen NO-Synthese auf den myokardialen ischämischen Schaden

**Dissertation zur Erlangung
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Anna Katharina Adamek
aus Loslau (Polen)**

Würzburg 2008

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter:

Gutachter:

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die hier vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2004 bis Dezember 2006 in der Kardiologischen Abteilung der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Universitätsklinik Würzburg angefertigt.

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt und zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein größter Dank gilt dem Betreuer meiner Doktorarbeit, **Herrn Priv.-Doz. Dr. Stefan Frantz** für die Bereitstellung interessanter, methodisch vielseitiger Projekte und die engagierte Betreuung. Die Möglichkeit selbständig zu experimentieren, und das in einer sehr angenehmen Atmosphäre, sorgte dafür, dass ich meinen Horizont auf vielen Gebieten erweitern konnte.

Herrn Prof. Dr. Thomas Roitsch möchte ich für die Bereitschaft danken, die fakultätsinterne Vertretung dieser Dissertation zu übernehmen, wodurch diese Promotion erst möglich wurde.

Dem Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik I, **Herrn Prof. Dr. Georg Ertl**, danke ich für die Möglichkeit, dass ich meine Doktorarbeit an der Klinik durchführen konnte. Ich habe mich als Apothekerin unter der großen Anzahl von Ärzten immer sehr wohl gefühlt.

Herr Prof. Dr. Johann Bauersachs hat mich immer hilfsbereit und fördernd unterstützt, dafür möchte ich ihm danken.

Ganz besonders danke ich meinen Arbeitskolleginnen **Helga Wagner, Barbara Bayer, Charlotte Dienesch** und **Heidi Scheuermann** für das außerordentlich gute Arbeitsklima und die Unterstützung, die ich jederzeit bekommen habe.

Erwähnen möchte ich an dieser Stelle die schöne und kameradschaftliche Atmosphäre im Forschungscontainer. Der Arbeitsalltag wurde dort durch die traditionellen Laborpartys aufgelockert, die mir immer in Erinnerung bleiben werden.

Frau Dr. Christina Zürn möchte ich für die zahlreichen Tipps und Hilfestellungen danken, die mir oft das Leben erleichtert haben. Besonders freut es mich, dass sich daraus eine schöne Freundschaft entwickelt hat.

Ganz besonderer Dank gilt meinen **Eltern** und meiner Schwester **Alexandra** für die großzügige und liebevolle Unterstützung, ohne die mein Erfolg im Studium und in der Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meinem Freund **Dr. Björn Lengenfelder** bin ich sehr dankbar für seine unendliche Geduld, sein Verständnis und seine Liebe. Ohne ihn wäre die Zeit in Würzburg nie so schön gewesen.

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1.	ZUSAMMENFASSUNG	4
2.	SUMMARY	6
3.	EINLEITUNG	8
3.1	ISCHÄMIE/REPERFUSION (I/R).....	9
3.1.1	Oxidativer Stress	9
3.1.2	Antioxidative Schutzmechanismen	11
3.1.3	Stickstoffmonoxid (NO).....	11
3.1.4	Inflammation	13
3.2	REMODELING	19
4.	PROBLEMSTELLUNG	23
5.	MATERIAL	25
5.1	CHEMIKALIEN	25
5.1.1	Tieroperationen.....	25
5.1.2	RNA-Gewinnung.....	25
5.1.3	cDNA-Gewinnung	25
5.1.4	Real-Time-PCR	26
5.1.5	Immunhistochemie.....	26
5.1.6	ELISA	27
5.1.7	EMSA	27
5.1.8	HPLC.....	27
5.2	LÖSUNGEN	27
5.3	VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	29
5.4	GERÄTE UND ZUBEHÖR	30
5.5	VERSUCHSTIERE UND TIERHALTUNG	31
6.	METHODEN	32
6.1	TIEROPERATIONEN	32
6.1.1	Methode der Ischämie/Reperfusion	32
6.1.2	Infarktfärbung und Probengewinnung.....	33
6.1.3	Modell des Myokardinfarkts	35
6.2	ECHOKARDIOGRAPHISCHE BILDGEBUNG	36
6.2.1	Durchführung.....	36
6.2.2	Echokardiographische Analyse.....	36
6.3	HÄMODYNAMIK.....	37
6.4	ORGANENTNAHME.....	37
6.5	INFARKTGRÖßENBESTIMMUNG	37
6.6	KOLLAGENGEHALTSBESTIMMUNG	38
6.7	RNA-EXTRAKTION	38
6.8	REVERSE TRANSKRIPTION	39
6.9	QUANTITATIVE PCR MITTELS DER TAQMAN-TECHNOLOGIE	40
6.9.1	Grundlagen	40
6.9.2	TaqMan-PCR-Bedingungen	42

6.9.3	Plasmid-Standard für die Real-Time-PCR	43
6.10	IMMUNHISTOCHEMIE	44
6.10.1	Grundlagen	44
6.10.2	Durchführung	45
6.11	GEWINNUNG DER NUKLEÄREN UND ZYTOSOLISCHEN PROTEINE	46
6.12	PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD	46
6.13	ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)	47
6.13.1	Grundlagen	47
6.13.2	Durchführung	47
6.14	EMSA (ELEKTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY)	48
6.14.1	Grundlagen	48
6.14.2	Durchführung	48
6.15	MDA (MALONDIALDEHYD)-MESSUNG MITTELS HPLC	49
6.15.1	Grundlagen	49
6.15.2	Durchführung	50
6.16	STATISTISCHE AUSWERTUNG	50
7.	ERGEBNISSE	51
7.1	PROTEKTIVER EFFEKT EINES eNOS-MODULATORS IN VIVO	51
7.1.1	Ischämie/Reperfusion-Ergebnisse	51
7.1.2	eNOS-Expression	54
7.1.3	Aktivierung der Enzyme AKT und pAKT	55
7.1.4	Oxidativer Stress	56
7.1.5	Nitrotyrosin	57
7.1.6	Antioxidantien	58
7.1.7	Einwanderung neutrophiler Granulozyten	58
7.1.8	ICAM/LIX-Expression	60
7.1.9	Proinflammatorische Proteine	61
7.2	ROLLE VON NF- κ B IN DER ISCHÄMIE/REPERFUSION	62
7.2.1	Ischämie/Reperfusion-Ergebnisse	63
7.2.2	NF- κ B Aktivierung	64
7.2.3	Proinflammatorische Proteine	65
7.2.4	Einwanderung neutrophiler Granulozyten	68
7.2.5	Funktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Leukozyten	70
7.3	EINFLUSS VON ASPIRIN AUF DEN MYOKARDINFARKT	73
7.3.1	Hämodynamische Untersuchung	74
7.3.2	Echokardiographische Untersuchung	77
7.3.3	Kollagenbestimmung	80
7.3.4	Aktivierung von NF- κ B	81
7.3.5	Proinflammatorische Proteine	82
8.	DISKUSSION.....	86
8.1	PROTEKTIVER EFFEKT EINES eNOS-MODULATORS IN VIVO	86
8.2	ROLLE DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS NF- κ B IN DER ISCHÄMIE/REPERFUSION	91
8.3	HOCHDOSIERTE ASPIRIN-BEHANDLUNG UND LINKSVENTRIKULÄRES REMODELING NACH MYOKARDINFARKT	95
9.	ABKÜRZUNGEN.....	100
10.	PUBLIKATIONSLISTE.....	102

11.	LITERATUR.....	103
12.	CURRICULUM VITAE	110
13.	ERKLÄRUNGEN	111

1. Zusammenfassung

Die Entwicklung von therapeutischen Strategien, die den infarktbedingten Untergang des Myokardgewebes minimieren und die Gewebsheilung nach abgelaufenem Myokardinfarkt unterstützen, gehört zu dem Hauptziel in der modernen Kardiologie. Bis jedoch eine spezifische Intervention als Therapieform anerkannt wird, ist ein detailliertes Entschlüsseln der zellulären und molekularen Mechanismen während und nach der Myokardschädigung notwendig.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich intensiv mit den Vorgängen der Stickstoffmonoxid- (NO) Produktion und der Inflammation nach Okklusion von Kranzarterien.

Im ersten Teil der Dissertation steht die endotheliale NO-Synthase-Expression (eNOS) im Mittelpunkt der Untersuchung. eNOS ist als wichtiger Katalysator an der Biosynthese von Stickstoffmonoxid, das als protektiver Faktor für die Gefäßhomöostase seit Jahren bekannt ist, beteiligt. Ferner besteht experimentell sehr gute Evidenz dafür, dass der endotheliale NO-Synthase am Ausmaß des kardialen Ischämie-/Reperfusionsschadens eine entscheidende Rolle zukommt. Folglich wurde mittels der Substanz AVE 9488 versucht, die eNOS-Expression in Mäusen zu steigern und den Effekt auf das Infarktgeschehen näher zu betrachten. Die Behandlung mit AVE 9488 erzielte einen signifikant reduzierten Ischämie-/Reperfusionsschaden. Bei anschließenden Ischämie-/Reperusionsversuchen mit eNOS defizienten Mäusen war der protektive Effekt wieder aufgehoben. Der Erfolg dieser Substanz wird in der signifikanten Reduktion des oxidativen Stresses vermutet.

Ein zusätzlicher wichtiger Parameter, der während der Ischämie/Reperfusion aktiviert wird, ist der Schlüssel-Transkriptionsfaktor Nuclear Factor kappa B (NF- κ B). Durch seine Bindung an bestimmte Enhancer und Promotoren reguliert der Faktor die Entzündungsprozesse, indem er die Genexpression proinflammatorischer Marker verstärkt. Folglich wurden eine Reduktion der Inflammation sowie ein protektiver Effekt nach erfolgter ischämischer Schädigung durch Hemmung von NF- κ B angenommen. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden NF- κ B-Untereinheit p50 defiziente Mäuse (p50 KO) einer Okklusion einer Herzkranzarterie unterzogen. Durch die Hemmung der NF- κ B-Aktivierung kam es zu einer signifikanten Reduzierung des Infarktareals im Vergleich zu

den entsprechenden Wildtyp-Mäusen. Der große Benefit konnte auf die geringere Einwanderung der neutrophilen Granulozyten in das infarzierte Gebiet zurückgeführt werden. Knochenmarktransplantationsversuche mit p50 KO- und Wildtyp-Knochenmark untermauerten die Beobachtung, dass die beeinträchtigte Aktivierung von NF- κ B in p50 defizienten Leukozyten protektive Effekte in der Ischämie/Reperfusion vermittelt.

Die Aktivierung der proinflammatorischen Proteine während des linksventrikulären Remodelings nach Myokardinfarkt gehört zum Fokus des dritten Teils dieser Arbeit. Dieser Teil beschäftigt sich mit der Frage, inwieweit eine hochdosierte Aspirin-Therapie die linksventrikulären Umbauprozesse günstig beeinflussen kann.

Dafür wurden Mäuse für 4 Wochen mit Placebo oder Aspirin (120 mg/kg pro Tag) mittels osmotischer Mini-Pumpen, die 2 Stunden nach Ligatur der Kranzarterie implantiert wurden, behandelt. In beiden Gruppen kam es zur erwarteten linksventrikulären Dilatation nach Myokardinfarkt, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen Placebo- und Aspirin-behandelten Tieren. Es kam allerdings zu einer erwarteten Reduktion proinflammatorischer Proteine durch die Aspirin-Therapie. So war die Expression von Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) in der Aspirin-Gruppe signifikant reduziert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die gezielte Beeinflussung bestimmter Faktoren in der Ischämie/Reperfusion wie z. B. die Verstärkung der eNOS-Expression oder die Hemmung der NF- κ B-Aktivierung die Ischämieschädigung signifikant reduziert werden kann.

2. Summary

One of the major therapeutic goals of modern cardiology is to design strategies aimed at minimizing myocardial necrosis and optimizing cardiac repair following myocardial infarction. However, a sound understanding of the cellular and molecular mechanism is necessary before a specific intervention is pursued on a therapeutic basis.

The present work includes important aspects of inflammation and nitric oxide (NO) production after occlusion of the coronary artery.

The first part of the thesis focused on endothelial NO synthase (eNOS). eNOS is a promotor of NO biosynthesis, which regulates vascular and myocardial function. Moreover, endothelial NOS is cardioprotective in ischemia/reperfusion injury. Therefore, the effects of AVE 9488, a novel pharmacoon designed to selectively increase eNOS protein expression and NO formation, was tested on cardiac ischemia/reperfusion injury in vivo.

Ischemia/reperfusion damage was significantly reduced in mice treated with AVE 9488 when compared to placebo treated mice. The protective effect was blunted in eNOS knockout mice treated with the eNOS enhancer. The expression of inflammatory markers was not influenced by the therapy. Reactive oxygen species were significantly reduced in mice treated with the eNOS enhancer.

In addition, the transcription factor nuclear factor kappa B (NF- κ B) is important in cardiac damage. NF- κ B is activated by various stimuli implicated in ischemia/reperfusion injury and increases the expression of proinflammatory markers by binding on special enhancer and promoters. Inhibition of NF- κ B might therefore reduce the inflammatory response and achieve protective effects after myocardial infarction. To prove this hypothesis mice with targeted deletion of the NF- κ B subunit p50 (p50 KO) underwent 30 minutes of coronary artery ligation and 24 hours of reperfusion in vivo. Ischemia/reperfusion damage was significantly reduced in the p50 KO animals when compared with matching wild-type (WT) mice.

Although adhesion molecules such as intercellular adhesion molecule were up-regulated in left ventricles of p50 KO mice, fewer neutrophils infiltrated the infarct area, suggesting leukocytes as a potential mediator of the protection observed in the p50 KO. This was confirmed in adoptive transfer experiments: whereas transplantation of KO

bone marrow in KO animals sustained the protective effect on ischemia/reperfusion injury, transplantation of WT bone marrow in KO animals abolished it.

The last part tested the hypothesis that inhibition of the proinflammatory response to myocardial infarction could improve left ventricular remodeling. Therefore, mice were treated for 4 weeks with placebo or aspirin (120 mg/kg per day) by Alzet mini-osmotic pumps implanted 2 hours after ligation of the left anterior descending artery. On echocardiography, animals 4 weeks after myocardial infarction exhibited left ventricular dilatation as expected. However, there was no difference between the placebo and the Aspirin group. The expression of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin 1 β (IL-1 β) which were markedly upregulated in mice with myocardial infarction on placebo were significantly reduced by Aspirin treatment. However, left ventricular remodeling after myocardial infarction was not altered.

In conclusion, the use of specific strategies to inhibit the NF- κ B activation or to increase eNOS expression in ischemia/reperfusion constitutes a promising novel therapeutic approach to reduce ischemic damage. However, successful application of anti-inflammatory interventions in the treatment of ischemic remodeling will require a better understanding of the specific molecular steps in the regulation of cardiac injury and repair.

3. Einleitung

Das Herz stellt einen in etwa faustgroßen, hochpotenten Muskel dar, der über 6000 Liter Blut täglich durch den menschlichen Körper pumpt und somit die einzelnen Organe mit Sauerstoff und lebensnotwendigen Nährstoffen versorgt und die Ausscheidung von Abbauprodukten unterstützt. Daher liegt die Vermutung nahe, dass eine Herzfunktionsstörung mit verheerenden physiologischen Konsequenzen verbunden ist. Im Jahr 2005 zählte die koronare Herzerkrankung laut Statistischem Bundesamt mit 44,2 % zu den häufigsten Todesursachen in der Bundesrepublik Deutschland. Dabei fielen 9,0 % auf die chronisch-ischämischen Herzerkrankungen und 8,5 % auf den akuten Myokardinfarkt (www.destatis.de).

Als Ursache für den Myokardinfarkt tritt meistens ein unvermittelt auftretender Koronararterienverschluss auf, der durch Ruptur einer atheromatösen Plaque mit nachfolgender Thrombozytenaktivierung und –aggregation ausgelöst wird. Die daraus resultierende Myokardischämie führt zur Ausbildung einer Gewebnekrose. Durch den Verlust von kontraktilem Myokard wird eine Kaskade von Entzündungsprozessen getriggert und dadurch reparative Vorgänge wie Dilatation, Hypertrophie und Ausbildung einer Narbe aus kollagenem Bindegewebe induziert [1].

Um das Ausmaß eines Infarktes so weit wie möglich zu begrenzen, ist eine frühe, vollständige und anhaltende Reperfusion des ischämischen Myokards erforderlich, bevor das Herz irreversibel geschädigt wird. Therapeutisch haben sich dabei die Thrombolyse, die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) und die koronare Bypass-Operation bewährt [2].

So unverzichtbar die Reperfusion des ischämischen Gewebes ist, führt sie jedoch durch Freisetzung von radikalen Sauerstoffspezies und Entzündungsfaktoren zu weiteren reversiblen und irreversiblen Schäden [3, 4].

Aus diesem Grund gelten die Entwicklung und der Einsatz von Substanzen, die die Inflammationskaskade sowie die Bildung von Sauerstoffradikalen eindämmen, als große Herausforderung in der kardiologischen Forschung bei der Therapie des Myokardinfarktes.

3.1 Ischämie/Reperfusion (I/R)

3.1.1 Oxidativer Stress

Die Hypothese, dass es nach der Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung im ischämischen Myokard zur Bildung eines Reperfusionsschadens durch freie Radikale kommt, wurde durch die Beobachtung bestätigt, dass

- Reperfusion Herzfunktionsstörungen verursacht [5],
- es zu einer enormen Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies kommt [6, 7],
- Therapie mit Antioxidantien den Myokardschaden verringert [8] und
- Applikation von Radikalen vergleichbaren Schaden verursacht [9].

Mit Hilfe von Elektronen-Resonanz-Spektroskopie konnte nachgewiesen werden, dass es bereits während der ersten Minuten der Reperfusion zur Bildung von großen Mengen an Radikalen kommt. Dabei spielen die Sauerstoffradikale und die davon abgeleiteten reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) die entscheidende Rolle [10, 11]. Dazu zählen die Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$), die sehr reaktionsfähigen Hydroxyl-Radikale (OH^{\cdot}), das Stickstoffmonoxid (NO), das Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot}$) sowie das nichtradikale Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder die Hyperchlorsäure (HOCl), die aufgrund ihrer oxidativen Wirkung eine Radikalbildung begünstigen [12].

Als intrazelluläre Hauptquelle für die Freisetzung der Radikale gilt besonders die mitochondriale Atmungskette [13]. Dabei entsteht aus molekularem Sauerstoff die größte Menge an Superoxidanionen. Neben der mitochondrialen Atmungskette führen viele enzymatische Mechanismen zur Bildung reaktiver Spezies, wie z. B.:

- Xanthinoxidase beim Purinabbau
- Cyclooxygenase beim Arachidonsäuremetabolismus
- Lipoxygenase
- Katecholaminoxidation

Eine weitere wichtige Rolle in der Entstehung von Sauerstoffradikalen spielen die neutrophilen Granulozyten [14]. Bei der Reperfusion des ischämischen Gewebes wandern die genannten Zellen rasch in das geschädigte Areal unter Freisetzung proteolytischer Enzyme und reaktiver Radikale wie den zytotoxischen Superoxidanionen sowie der Hypochlorsäure.

NO als Produkt der endothelialen NO-Synthase (eNOS) ist einerseits von großer Wichtigkeit bei der Aufrechterhaltung der Gefäßwand-Homöostase, andererseits kommt es bei einigen pathologischen Prozessen, wie der Ischämie/Reperfusion, zu einem „eNOS uncoupling“ [15]. Dabei bildet eNOS die Hauptquelle für die Produktion von Superoxidanionen, die mit Stickstoffmonoxid das sehr reaktive Peroxynitrit (ONOO^-) bildet.

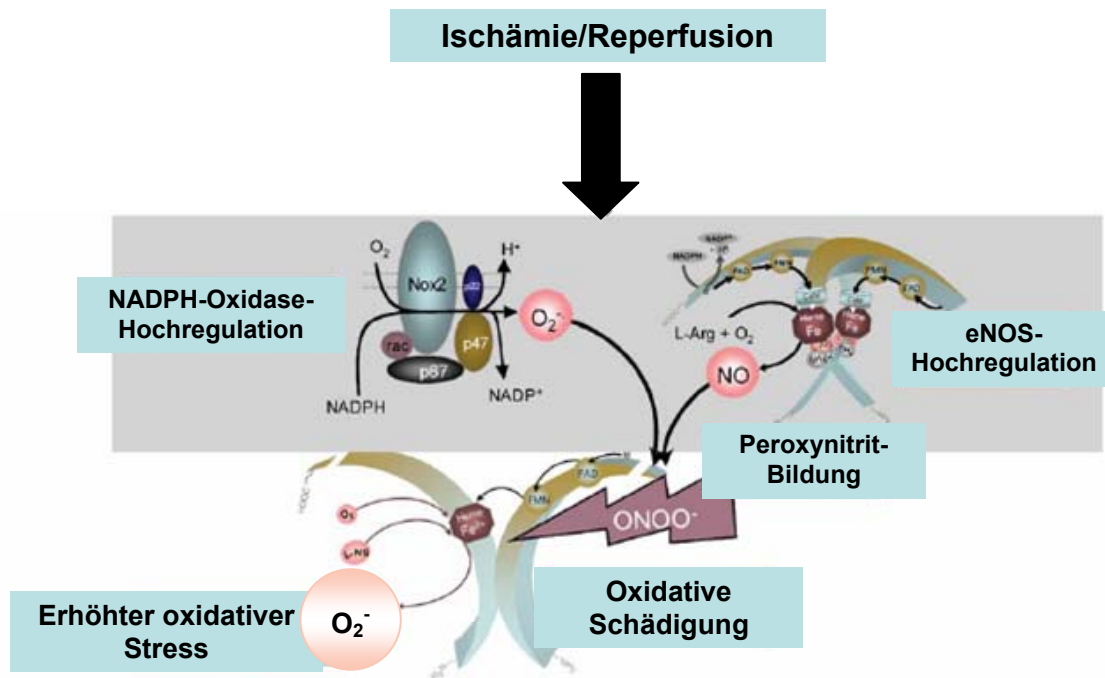


Abbildung 1:

Oxidativer Stress nach Ischämie/Reperfusion (I/R): Nach I/R kommt es zur Hochregulation der NADPH-Oxidase und der endothelialen NO-Synthase (eNOS). Die Produkte der beiden Enzyme reagieren sofort unter Bildung von Peroxynitrit. Dieser oxidiert anschließend den essentiellen eNOS-Cofaktor BH_4 und verursacht oxidative Schädigung im Zink-Thiolat eNOS-Komplex. Als Konsequenz kommt es zu einem „eNOS-uncoupling“, bei dem anstatt NO vermehrt Superoxid gebildet wird. Dies führt folglich zum oxidativen Stress (modifiziert nach Förstermann [16]).

Von großer physiologischer Bedeutung sind die gewebetoxischen und zytotoxischen Effekte der reaktiven Spezies. Sie reagieren mit den Proteinen, Membranlipiden und Nukleinsäuren [11, 17, 18]. Folglich führt die Oxidation der funktionellen Gruppen der Aminosäuren zur Strukturänderung und somit zum Funktionsverlust vieler Enzyme und Strukturproteine, die Peroxidation der Lipide führt zur Zerstörung der Membranintegrität.

3.1.2 Antioxidative Schutzmechanismen

Unter physiologischen Bedingungen werden geringe Mengen von freigesetzten Radikalen, die beim Elektronentransfer in Mitochondrien, Peroxisomen und Zytosol entstehen, durch zelluläre Schutzsysteme deaktiviert. Das antioxidative Schutzsystem reagiert auf die oxidativen Spezies, indem es diese und ihre Vorstufen abfängt, ihre Bildung hemmt und endogene antioxidative Abwehr verstärkt.

Bei der Ischämie/Reperfusion wird dieser Mechanismus jedoch durch die große Menge an reaktiven Substanzen überlastet und sogar zerstört. Eines der Hauptantioxidantien stellt die Superoxiddismutase (SOD) dar. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von Superoxid zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. Zwei Isoformen der Dismutase kommen in der Zelle vor: die zytosolische Cu_2Zn_2 -SOD und die mitochondriale Mn-SOD [19, 20].

Die Katalase, ein membrangebundenes Peroxisomen-Enzym, spielt in der Abwehr der Radikale in der Ischämie/Reperfusion eine untergeordnete Rolle, unterstützt jedoch weitere Schutzmechanismen bei der Deaktivierung von Wasserstoffperoxid, welches zu Sauerstoff und Wasser disproportioniert.

Ein weiteres wichtiges Enzym, welches die Radikale in unschädliche Moleküle umwandelt, ist die Glutathion-Peroxidase. Dieses Enzym katalysiert die Peroxidation von Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von reduziertem Glutathion, wobei Wasser und Glutathiondisulfid entstehen [21].

3.1.3 Stickstoffmonoxid (NO)

Das kurzlebige Radikal NO übt eine Vielzahl biologischer Wirkungen in praktisch allen Organsystemen des Körpers aus und ist für die Physiologie und Pathophysiologie des Zirkulationssystems sowie für die Therapie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen von großer Bedeutung.

Stickstoffmonoxid wird konstitutiv vom Gefäßendothel freigesetzt und dient somit als Schutz vor kardiovaskulären Erkrankungen. Das genannte Molekül ist als Vasodilatator bekannt, reduziert die Leukozyten-Endothelzellen-Interaktion, hemmt die

Plättchenadhäsion und –aggregation, inhibiert die Proliferation von glatten Muskelzellen und reguliert die Kardiomyozytenfunktion [22, 23].

Als kleines, sehr gut diffusibles Molekül passiert NO mühelos Zellmembranen. Zielmolekül ist die lösliche Guanylatcylase (sGC). Dieses Enzym katalysiert nach Stimulation mit NO die Reaktion von Guanodin-Triphosphat (GTP) zu cyclischem Guanodin-Monophosphat (cGMP), welches die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum als auch den Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum durch Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinasen hemmt.

Für die Biosynthese von NO wird die Aminosäure L-Arginin umgesetzt. Bei dieser Reaktion, die durch eine Familie von Isoenzymen, den NO-Synthasen (NOS), katalysiert wird, entsteht L-Citrullin als Nebenprodukt. Allen NO-Synthasen gemeinsam ist der Bedarf an NADPH, FAD, FMN und Tetrahydrobiopterin als Ko-Faktoren [24].

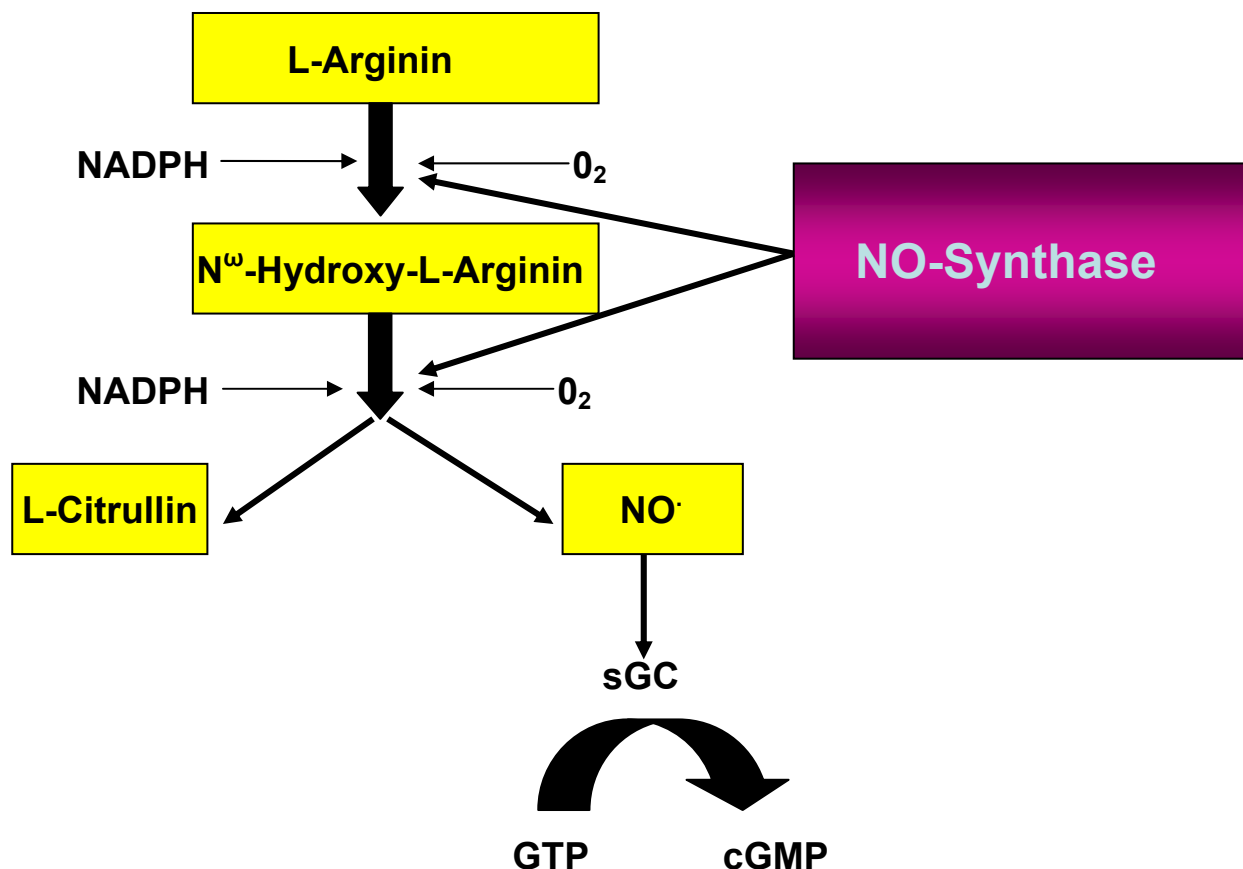


Abbildung 2:

Reaktionsweg zur Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) aus L-Arginin mittels NO-Synthase (modifiziert nach Pagliaro [25]).

Die drei wichtigsten Isoformen der NO-Synthase sind die endotheliale NOS (eNOS), die neuronale NOS (nNOS) sowie die induzierbare NOS (iNOS) [26]. Die beiden Enzyme nNOS und eNOS sind calciumabhängig und in vielen Geweben konstitutiv vorhanden, während die iNOS-Isoform unabhängig von der Ca-Konzentration durch inflammatorische Zytokine oder durch Ischämie induziert wird. Somit werden von eNOS und nNOS nur geringe NO-Mengen (nM) für die physiologischen Bedürfnisse freigesetzt, die iNOS dagegen produziert NO in hohen Konzentrationen (μM) [27].

Folglich spielt das durch die eNOS katalysierte NO-Molekül eine protektive Rolle in der Ischämie/Reperfusion, wie bereits in einigen Studien gezeigt wurde. Mäuse, die das eNOS-Enzym überexprimierten, wiesen einen kleineren Ischämie/Reperfusion-Schaden auf, dagegen entwickelten Mäuse, bei denen das eNOS-Gen ausgeschaltet wurde, größere Infarkte [28].

Auf der anderen Seite hatten iNOS-defiziente Mäuse eine bessere linksventrikuläre Funktion und bessere Überlebensraten nach Myokardinfarkt trotz gleicher Infarktgrößen.

3.1.4 Inflammation

Die enorme Entzündungsreaktion in der frühen Reperfusionsphase ist einerseits von großer Bedeutung für den Heilungsprozess, andererseits mit einer Ausweitung des Gewebeschadens verbunden. Bereits eine Stunde nach Wiedereröffnung des Gefäßes wurden in mehreren I/R-Tiermodellen erhöhte Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) gefunden [29, 30]. Dies korrelierte signifikant mit der Größe der Gewebsverletzung. Weitere Untersuchungen an Patienten nach einer Bypass-Operation zeigten ebenfalls einen Anstieg der Entzündungsmediatoren im Serum [31, 32] sowie im Myokardgewebe [33]. Als Hauptquelle für die Freisetzung dieser biologisch aktiven Proteine gelten vorrangig die mononukleären Phagozyten, daneben können weitere Zelltypen, wie z. B. Mastzellen und Kardiomyozyten, diese Faktoren synthetisieren [34-36].

IL-1 β , das neben IL-1 α an die beiden Rezeptoren IL-1 Rezeptor Typ 1 und Typ 2 bindet, ist ein Vermittler der Immunantwort und aktiviert das Gefäßendothel und die Produktion von Chemokinen, welche wiederum Lymphozyten aktivieren und somit den

lokalen Gewebeschaden modulieren. IL-1 β ist besonders an der Akutphase-Reaktion beteiligt [37]. Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) der bereits 1975 bei der Untersuchung zur endotoxininduzierten „hämorrhagischen Nekrose“ von Tumoren entdeckt wurde [38], entfaltet seine Wirkung mittels der ubiquitären Rezeptoren TNFR-1 und TNFR-2. Die phänotypische Expression dieser Rezeptoren zeigt jedoch wesentliche Unterschiede auf. Während TNFR-1 als der wichtige Rezeptor angesehen wird, da über diesen die intrazellulären Wirkungen von TNF- α , wie die Regulierung der NO-Synthase-Aktivität, Induktion der Adhäsionsmoleküle am Endothel (ICAM/VCAM), Stimulation von mononukleären Phagozyten, Aktivierung der Akutphase-Reaktion und Zytotoxizität vermittelt werden [37], spielt der in größerer Zahl vorhandene TNFR-2 vor allem bei der Regulierung der TNF- α -Konzentration eine Rolle.

Die Rolle des Zytokins TNF- α in der Ischämie/Reperfusion wird immer noch kontrovers diskutiert. Während einige Studien von protektiven Effekten des proinflammatorischen Zytokins berichten [39], z.B. durch Reduktion des Myokardschadens, weisen andere Studien auf eine pathologische Wirkung eines erhöhten TNF-Spiegels in der Herzerkrankung hin [40]. In Tiermodellen konnte man besonders die hämodynamischen (verminderter totaler peripherer Widerstand) und kardiodepressiven Effekte (verminderte Kontraktionsfähigkeit, biventrikuläre Dilatation) beobachten [41], die vor allem durch die Beeinflussung der Calcium-Homöostase, direkte Zytotoxizität, myozytäre Apoptose, Störung in der elektromechanischen Kopplung sowie durch Induktion anderer an der Kardiodepression beteiligter Zytokine (IL-1 β) [30] [31] ausgelöst werden.

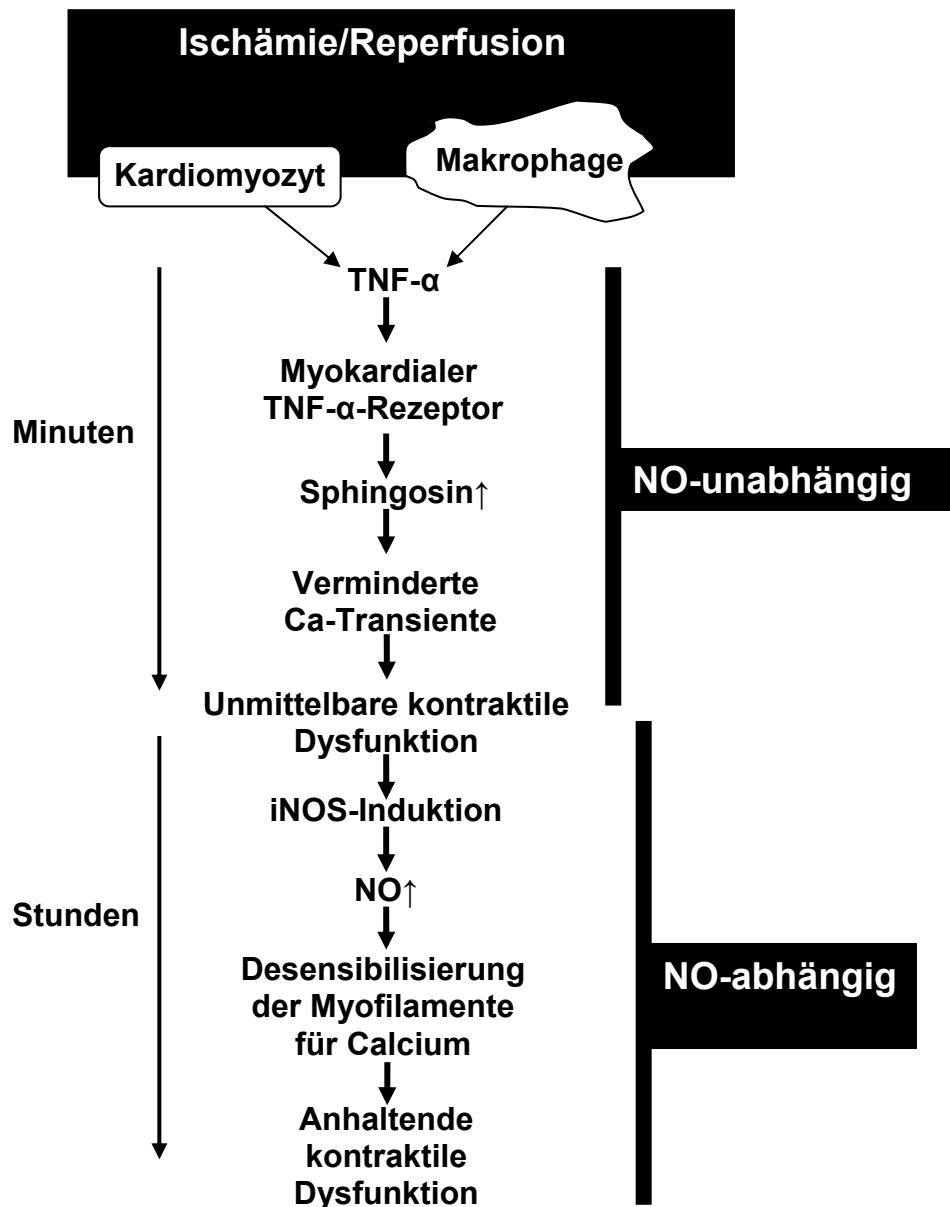


Abbildung 3:

Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) Bildung und damit zusammenhängende kontraktile Dysfunktion nach Ischämie/Reperfusion (modifiziert nach Meldrum [40]).

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Ausweitung des Reperfusionsschadens ist die Förderung entzündlicher Prozesse durch TNF, so z. B. die Aktivierung und Infiltration neutrophiler Granulozyten.

Die Leukozyten-Akkumulation im Myokardgewebe, welches einer ischämischen Phase ausgesetzt wurde, wurde bereits in histologischen Untersuchungen vor über 60 Jahren durch Malory beobachtet [42]. Im Weiteren führte eine Neutrophilen-Depletion bei Tieren, die anschließend einer Ischämie/Reperfusion unterzogen wurden, zu einer

deutlichen Verkleinerung der Infarktgröße. Diese Untersuchungen ließen die Schlussfolgerung zu, dass neutrophile Granulozyten einen großen Teil zum Entstehen des Myokardschadens, der durch die Okklusion und Wiedereröffnung der Koronararterie ausgelöst wurde, beitragen [43] [44].

Die Rekrutierung der neutrophilen Zellen zum Entzündungsareal erfordert initial eine Adhäsion an das Gefäßendothel mit anschließender extrazellulärer Migration [45]. Dafür exprimieren beide Zelltypen bestimmte Adhäsionsmoleküle, wie z. B. Selektine (P-, E-Selektin), Intergrine (CR-3, CR-4, LFA-1) und Immunglobuline (ICAM, VCAM, PECAM). Die Selektine auf dem aktivierten Endothel starten die Endothel/Leukozyten-Wechselwirkung, indem sie an Oligosaccharide (Sialyl-Lewis) auf der Zelloberfläche von Leukozyten binden. Dies hat zur Folge, dass die Leukozyten entlang des Endothels „rollen“. Der nächste Schritt ist die eine feste Adhäsion der Leukozyten an das Endothel. Dies kommt durch eine Chemokin-vermittelte Ausbildung einer affineren Bindung von ICAM des aktivierten Endothels an Leukozyten-Integrine der Leukozyten zustande. Die Diapedese wird durch Integrine und das Immunglobulin-ähnliche PECAM, welches sowohl am Endothel als auch auf Leukozyten exprimiert wird, ermöglicht [46].

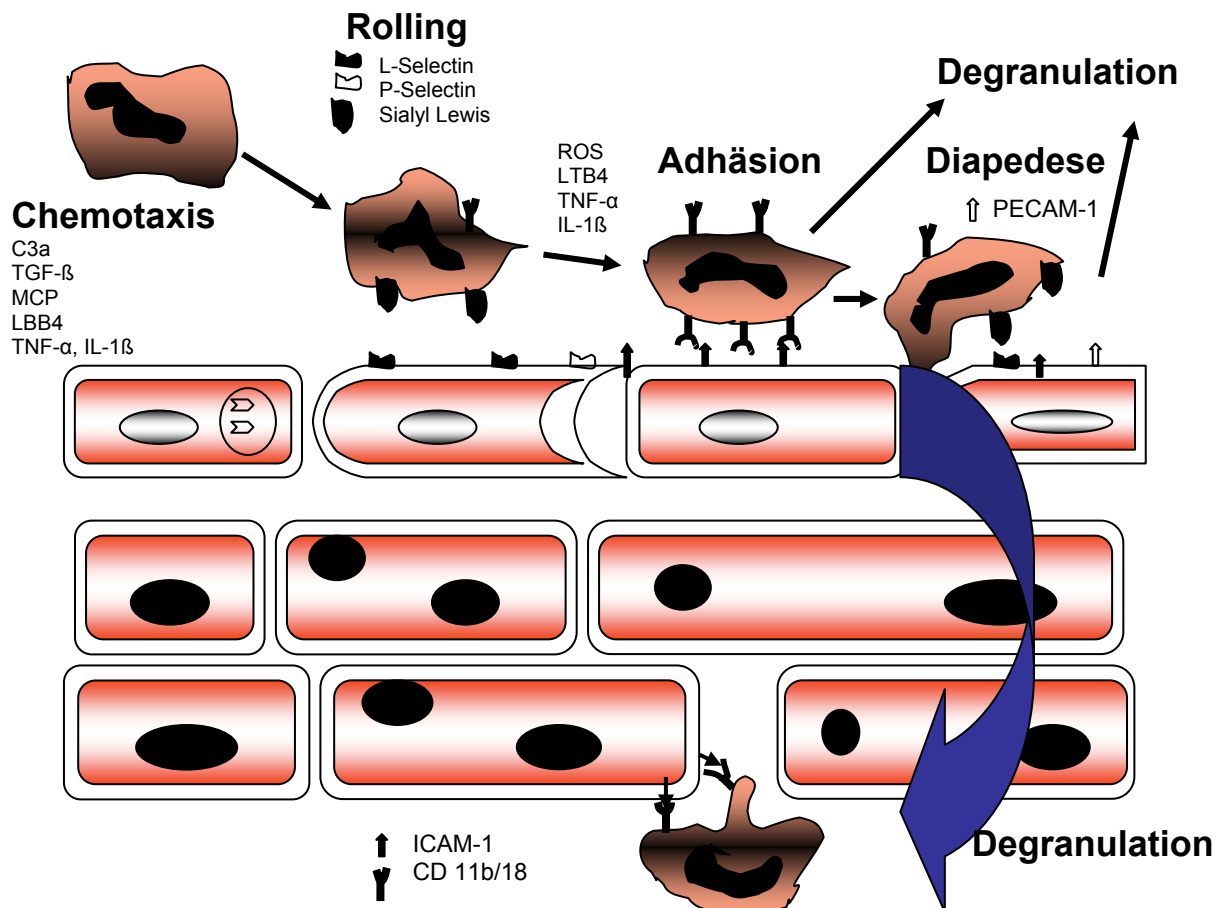


Abbildung 4:

Stationen der Neutrophilen-Aktivierung (modifiziert nach Kaminski und Bonda [11]).

Dabei setzen die adhärennten Granulozyten spezifische toxische Substanzen frei, die die Myokardschädigung vorantreiben. Neben den über 20 verschiedenen proteolytischen Enzymen (z. B. Serinprotease, Elastase, Collagenase), die die neutrophilen Zellen freisetzen und primär die extrazelluläre Matrix als Target haben, gelten die Leukozyten als Hauptquelle für die reaktiven Sauerstoffradikale [47]. Auf die zytotoxischen und gewebetoxischen Effekte der reaktiven Spezies wurde bereits eingegangen (Kap.1.1.1 „Oxidativer Stress“).

Das Schlüssel-molekül in der Entzündungsreaktion bei Ischämie/Reperfusion ist der Transkriptionsfaktor Nuclear Factor kappa B (NF- κ B). Als multifunktioneller und allgegenwärtiger Faktor ist NF- κ B an der Regulierung einer Vielzahl von Genexpressionen beteiligt, die insbesondere zu einer akuten Inflammation führen [48]. NF- κ B wurde erstmalig von Sen und Baltimore im Jahre 1986 als Transkriptionsfaktor am kappa-Leichtketten-Enhancer, einer spezifischen DNA-Region in reifen B-Lymphozyten

der Maus, beschrieben [49]. Des Weiteren wurde NF- κ B in vielen Zellpopulationen wie z. B. Monozyten, Granulozyten, Kardiomyozyten, Endothelzellen und Fibroblasten entdeckt.

Zur NF- κ B-Familie gehören neben den Untereinheiten p50 und p65 auch andere Untereinheiten wie p52, c-Rel und RelB an, die verschiedene Homo- und Heterodimere bilden können.

In der inaktiven Form ist NF- κ B durch Assoziation an das inhibitorische Protein I κ B- α im Zytoplasma lokalisiert. Bei Stimulierung kommt es zur Aktivierung des I κ B-Kinase-Komplexes (IKK). Dieser besteht aus den Kinasen IKK α und IKK β sowie der regulatorischen Untereinheit IKK γ . IKK β phosphoryliert bei I κ B- α die Serinreste 32 und 36. Phosphoryliertes I κ B wird nach seiner Polyubiquitinierung im Proteasom degradiert, so dass das freigesetzte NF- κ B-Dimer in den Kern translozieren kann. Dort besetzt NF- κ B sequenzspezifische DNA-Erkennungsmotive in der Promoterregion und verstärkt oder inhibiert die Gentranskription verschiedener Zielgene.

Bei Ischämie/Reperfusion hat man eine zweiphasige NF- κ B-Aktivierung beobachtet. Die erste Aktivierungsphase ist ca. 15 Minuten, die zweite 3 Stunden nach der Reperfusion messbar. Während die erste Stimulierung durch die freigesetzten Sauerstoffradikale verursacht wird, sind für die zweite Aktivierung die aus der ersten Phase entstandenen proinflammatorischen Zytokine verantwortlich [50, 51].

Für alle Mitglieder der Rel- und I κ B-Familie existieren mittlerweile Knock-Out-Modelle (KO). Die p65 Knock-Out-Embryonen sterben jedoch aufgrund von massiver Apoptose in der Leber [52], die p50 Knock-Out-Mäuse (p50 KO) dagegen zeichnen sich durch eine normale Entwicklung aus. In verschiedenen Krankheitsmodellen ist der Phänotyp der p50 KO-Mäusen jedoch sehr heterogen: Sie weisen einige Defekte in der Immunantwort [53] und in der Entwicklung der sekundären lymphatischen Organen auf [54]. Auf der anderen Seite sind diese Mäuse vor Diabetes geschützt, der durch Streptozotocin verursacht wird [55], sie haben reduzierte atherosklerotische Läsionen [56] und eine geringere Schädigung nach zerebraler Ischämie [57]. Aufgrund dieses relativ milden Phänotyps eignen sich die p50 KO-Mäuse als ideales Modell zur Unterdrückung der angeborenen Immunantwort und somit zur Untersuchung der Rolle von NF- κ B in der Ischämie/Reperfusion.

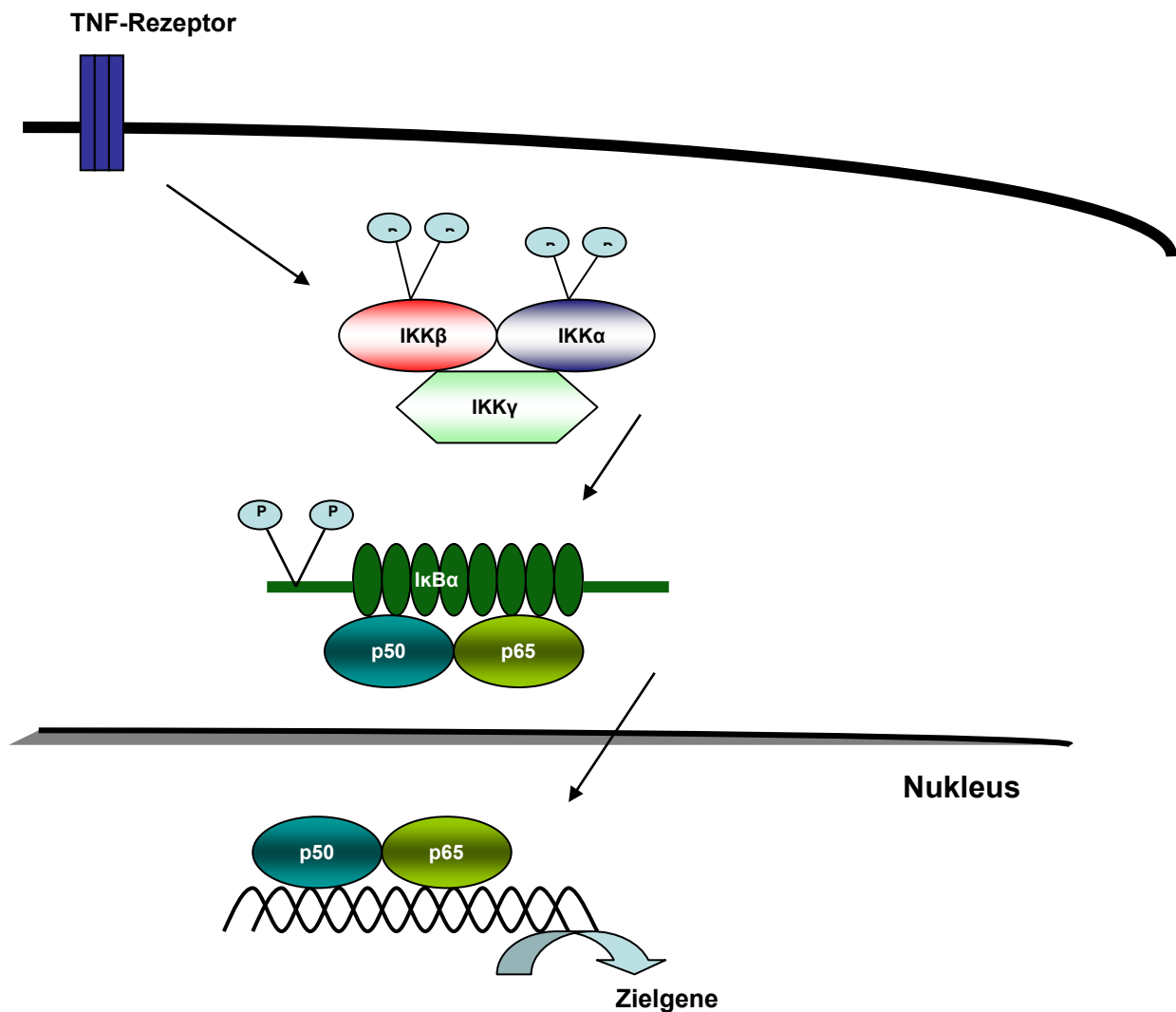


Abbildung 5:
Signalweg zur Aktivierung von NF-κB.

3.2 Remodeling

Falls nach einem Verschluss der Koronararterie die erforderliche Reperfusion zu spät eingeleitet wird, kommt es zur Entwicklung eines großen transmuralen Infarkts, der die linksventrikuläre Funktion beeinflusst und schließlich zum Remodeling führt [58].

Als Remodeling bezeichnet man die Anpassungs- und Umbauprozesse im infarzierten sowie nicht-infarzierten Gewebe, die mit Regulation der Ventrikelform, Ventrikelgröße und Ventrikelfunktion verbunden sind [59] [60] [61]. Durch die Myokardnekrose und die veränderte Hämodynamik wird eine Kaskade biochemischer intrazellulärer Vorgänge

getriggert und dadurch reparative Prozesse wie Dilatation, Hypertrophie und Ausbildung einer Narbe aus kollagenem Bindegewebe induziert [62] [63].

Man unterscheidet vier Phasen in der Wundheilung nach einem Infarkt. Während der ersten beiden Tage (Phase 1) kommt es zum Untergang der Kardiomyozyten und zur Aktivierung der akuten Entzündungskaskade (Phase 2). Anschließend folgen in den ersten Wochen nach Myokardinfarkt die Wiederherstellung der Blutversorgung im Herzen, die Bildung eines Granulationsgewebes (Phase 3) und schließlich die Remodelingprozesse verbunden mit Reparatur des infarzierten Bereiches (Phase 4) [64].

Phase 1: Untergang der Kardiomyozyten

Bereits sechs Stunden nach dem Verschluss der Koronararterie sind erste Anzeichen für das Absterben der Kardiomyozyten zu beobachten. Dieses Geschehen spiegelt sich im Anstieg einiger Serumparameter wider, wie z. B. dem Troponin T, der Kreatinkinase und der Serum- GO -Transaminase. Der Nachweis dieser Proteine wird als Marker für den Infarkt im klinischen Alltag verwendet.

Der Untergang der Zellen läuft entweder nach dem Mechanismus der Apoptose oder der Nekrose ab.

Durch die Nekrose werden Entzündungsprozesse aktiviert, wodurch die zweite Phase der Wundheilung eingeleitet wird [64].

Phase 2: Aktivierung der Entzündungskaskade

Die frühe Entzündungsphase nach Myokardinfarkt beginnt mit einer Aktivierung des Komplementsystems und der Freisetzung einiger Zytokine. In Tiermodellen wurde gezeigt, dass es in weniger als einem Tag nach Myokardinfarkt zu einem enormen Anstieg der $\text{IL-1}\beta$ - und $\text{TNF-}\alpha$ -mRNA-Expression im Infarktgebiet (über 50-fach) sowie im nicht-infarzierten Bereich (mehr als 15-fach) kommt [65]. Diese Hochregulation geht wieder auf den Ursprungswert zurück, falls es sich um einen kleinen Infarkt handelt. Bei großer Schädigung jedoch bleibt die Überexpression bestehen und führt zu einer chronischen Entzündung. Als Konsequenz daraus steigt ebenso die Aktivität der matrixabbauenden Enzyme (MMP-2 und -9) im Infarktreal, die Spiegel der natriuretischen Peptide (ANP und BNP) sowie die Kollagenexpression im nicht-infarzierten Myokard.

Bei Myokardinfarkt-Studien mit Mäusen, bei denen das TNF- α -Gen ausgeschaltet wurde (TNF^{-/-}Mäuse), zeigte sich, dass diese Tiere niedrigere ventrikuläre Rupturraten und eine verbesserte linksventrikuläre Funktion nach Koronarverschluss im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen aufweisen [66]. Dieses Phänomen wurde begleitet durch eine reduzierte Infiltration von Entzündungszellen, eine geringere Zytokin-Expression und niedrigere Aktivität der matrixabbauenden Protease 9 (MMP-9). Im weiteren Verlauf entwickelten die TNF^{-/-}Mäuse weniger Fibrose und Apoptose im nicht-infarzierten Gewebe, was sich in der verbesserten Ventrikelfunktion widerspiegelte.

Die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β nach Myokardinfarkt aktiviert NF- κ B, den Schlüssel-Transkriptionsfaktor in der Regulierung des Entzündungsprozesses. Die Aktivierung von NF- κ B führt zur Phosphorylierung und proteolytischen Degradation des inhibitorischen Proteins I κ B durch die spezifische I κ B-Kinase. Das freigesetzte NF- κ B-Dimer (meistens Heterodimer aus der p50- und p65-Untereinheit) transloziert in den Zellkern und bindet an Promotoren und Enhancer von Genen, die an der Inflammationskaskade beteiligt sind [67]: Zytokine (TNF- α), Immunorezeptoren (CD40), Adhäsionsmoleküle (ICAM), Apoptoseregulatoren (Bcl-2), stressinduzierte Gene (Superoxiddismutase), Wachstumsfaktoren (c-myc).

Die Entzündungsphase ist zusätzlich durch eine starke Infiltration neutrophiler Granulozyten in das Infarktgebiet gekennzeichnet. Die höchste Anzahl dieser Zellen ist 24 bis 48 Stunden nach dem Myokardinfarkt nachweisbar, wobei sie vor allem an der Beseitigung von abgestorbenen Kardiomyozyten beteiligt sind. Andere inflammatorische Zellen wie Lymphozyten und Makrophagen folgen den Neutrophilen in das Infarktgebiet und helfen bei der Entfernung der Zelltrümmer [68].

Phase 3: Bildung des Granulationsgewebes

Drei Tage nach dem Myokardinfarkt beginnt die Bildung des Granulationsgewebes im Randgebiet des infarzierten Areals. Dieses Gewebe ist reich an Entzündungszellen und Myofibroblasten und beinhaltet viele Blutgefäße. Von großer Bedeutung in der Gewebsheilung ist der Umbau der extrazellulären Matrix (ECM). Proteine, die am Aufbau der ECM beteiligt sind, werden vermehrt produziert, aber auch Proteine und Enzyme, die die ursprüngliche Matrix degradieren. Durch einen Abbau des kollagenen Netzwerks zwischen den Myozyten durch Serinproteinasen und eine Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen, die wiederum aus neutrophilen Granulozyten freigesetzt

werden, kommt es zur Infarktexpansion und somit zu einer Ausdehnung der linksventrikulären Wand [69, 70]. Es resultiert eine Ventrikeldilatation, welche eine Erhöhung der diastolischen und systolischen Wandspannung und somit eine Beeinträchtigung der globalen linksventrikulären Pumpfunktion verursacht.

Phase 4: Remodeling des Granulationsgewebes und Narbenbildung

Etwa vier Wochen nach der Myokardschädigung sind die nekrotischen Myozyten durch fibröses Bindegewebe ersetzt. Eine stabile Narbe wurde gebildet, bestehend aus einer Kollagenstruktur, kleinen Zellen und einigen Myofibroblasten, die im Narbengewebe verbleiben. Wundheilung ist somit ein komplexer Prozess aus Invasion, Transformation und Apoptose von verschiedenen Zelltypen [62, 64].

4. Problemstellung

Der Ischämie-/Reperfusionsschaden und die daraus resultierenden Remodelingprozesse spielen eine wichtige Rolle in der kardiologischen Forschung. Einerseits fehlen noch einige Erkenntnisse über die Regulationsmechanismen und die genaue Funktion der proinflammatorischen sowie oxidativen Mediatoren, andererseits stellt die Entwicklung geeigneter Substanzen, die gezielt in den Reaktionsweg dieser Noxen eingreifen, die Pharmaindustrie vor eine große Herausforderung.

Aus diesem Grund beschäftigt sich der zentrale Teil dieser Arbeit mit drei wichtigen Teilgebieten der Ischämie/Reperfusion und des chronischen Myokardinfarktes:

- 1) Seit einiger Zeit ist ein enger Zusammenhang zwischen der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und dem Ausmaß des entstehenden Ischämie-/Reperfusionsschadens bekannt. eNOS-Modulatoren gehören zu den neu entwickelten Substanzen, die die Expression der eNOS-mRNA steigern und somit die eNOS-Protein-Expression in den Endothelzellen verdoppeln. Das Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss des Wirkstoffs AVE 9488 des Pharmaunternehmens Sanofi-Aventis in einem Ischämie/Reperusionsmodell in vivo zu untersuchen und den Effekt auf das Infarktgeschehen unter besonderem Blick auf den oxidativen Stress und die Inflammation näher zu betrachten.
- 2) Vor dem Hintergrund, dass der Transkriptionsfaktor Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) während der Ischämie/Reperfusion im Herzmuskel verstärkt aktiviert wird, diente die hier vorliegende Studie dem Ziel, die Rolle dieses Faktors in den pathologischen Prozessen der Myokardischämie aufzuklären. Um die unspezifischen Effekte einer pharmakologischen Substanz zu vermeiden, wurden die Untersuchungen in einem Mausmodell durchgeführt. Neben den Wildtyp-Mäusen wurden die p50 KO-Mäuse, bei denen die p50-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- κ B ausgeschaltet ist, einer Okklusion mit einer darauf folgender Wiedereröffnung der Koronararterie unterzogen. Vor dem Hintergrund der Frage, ob ein protektiver Einfluss auf den Reperfusionsschaden erzielt

werden kann, wurden im nächsten Schritt die Infarktgröße und die damit zusammenhängende Entzündungsreaktion ermittelt.

- 3)** Proinflammatorische Proteine wie TNF- α und IL-1 β spielen eine wichtige Rolle für das linksventrikuläre Remodeling nach Myokardinfarkt. Diese Entzündungsmediatoren führen zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor kappa B (NF- κ B). Dieser wiederum ist an einer Aktivierung zahlreicher für den Ablauf einer Entzündung relevanter Gene beteiligt. Daher wurde in dieser Studie versucht, durch eine vierwöchige Therapie mit hochdosiertem Aspirin die Aktivierung der Entzündungsmediatoren zu unterdrücken und dadurch protektive Effekte zu erzielen. Als Modell diente der chronische Myokardinfarkt, bei dem die hämodynamischen Veränderungen, linksventrikulären Umbauprozesse und die Aktivierung von NF- κ B, in einem Zeitraum von vier Wochen untersucht wurden.

5. Material

5.1 Chemikalien

5.1.1 Tieroperationen

Materialbezeichnung	Firma
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Diethylether	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Evans-Blue	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Isofluran Forene	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Liquemin N 25000	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
NaCl 0,9 %	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Temgesic®	Essex, München, Deutschland
Tissue Tek® O.C.T	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande

5.1.2 RNA-Gewinnung

Materialbezeichnung	Firma
DEPC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
2-Propanol getrocknet	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolute	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Trichlormethan/Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRizol®Reagent	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

5.1.3 cDNA-Gewinnung

Materialbezeichnung	Firma
dNTP-Mischung	Promega, Mannheim, Deutschland
MLV H(-) Point Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim, Deutschland
Random Hexamers	Promega, Mannheim, Deutschland
RNAseH	Promega, Mannheim, Deutschland
RNAasin	Promega, Mannheim, Deutschland
RT-Puffer	Promega, Mannheim, Deutschland

5.1.4 Real-Time-PCR

Materialbezeichnung	Firma
Agarose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ampicillin 100x	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
iQ™ Supermix	Bio-Rad, München, Deutschland
Lennox L Agar	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Lennox L Broth Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
One Shot Competent E.coli	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
TaqMan® Gene Expression Assays	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
TOPO TA Cloning®-Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

TaqMan-Sonden von Applied Biosystems	Bezeichnung
18S	Hs99999901_s1
ecSOD	Mm00448831_s1
ICAM	Mm00516023_m1
IL-1β	Mm01336189_m1
LIX	Mm00436451_g1
NOS3	Mm00435204_m1
TNF-α	Mm99999068_m1

5.1.5 Immunhistochemie

Materialbezeichnung	Firma
Antigen Unmasking Solution 100x, pH 6	Linaris, Wertheim, Deutschland
Anti-rat IgG Biotin (BA-4001)	Linaris, Wertheim, Deutschland
Enthellan	Merck, Darmstadt, Deutschland
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Peroxidase Substrat Kit DAB (3,3` Diaminobenzidin)	Linaris, Wertheim, Deutschland
Rabbit Normal Serum	Linaris, Wertheim, Deutschland
Rat Anti-Mouse Neutrophiles monoklonal, clone 7/4	Linaris, Wertheim, Deutschland
Rotihistol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Vectastain ABC Kit	Linaris, Wertheim, Deutschland

5.1.6 ELISA

Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München, Deutschland
BSA, Protein-Standard	Bio-Rad, München, Deutschland
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PMSF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

5.1.7 EMSA

[α - ³² P]-ATP	Amersham, Freiburg, Deutschland
BSA, Protein-Standard	Bio-Rad, München, Deutschland
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kinase-Puffer	Promega, Mannheim, Deutschland
NF- κ B-Oligonukleotid	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Poly(dIdC)	Promega, Mannheim, Deutschland
Polyacrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
T4-Kinase	Promega, Mannheim, Deutschland

5.1.8 HPLC

Methanol	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
σ -Phosphorsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tetrahydropropan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Thiobarbitursäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland

5.2 Lösungen

PBS 10x, pH 7,2-7,4	80g NaCl
	2g KCl
	11,5g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
	2g KH ₂ PO ₄
	ad 1000ml H ₂ O
TTC 2 %	0,2 g 2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchlorid
	ad 10 ml PBS

Evans-Blue 5 %	2,5 g Evans-Blue 200 µl Liquemin N 25000 ad 50 ml PBS
Evans-Blue 5 % mit KCl	2,5g Evans-Blue 200 µl Liquemin N 25000 2,5 ml 1M KCl ad 50 ml PBS
Formalin 10 %, gepuffert	7,80 g Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei) 1,87 g Na ₂ PO ₄ x 2H ₂ O Ad 900 ml H ₂ O 100 ml Formalin
Pikrosiriusrotlösung	450 ml Pikrinsäure 0,6 g Säurefuchsin 0,1 g Siriusrot F3BA 1 ml 37 % HCl
DEPC-H ₂ O	1 ml DEPC Ad 1000 ml H ₂ O, rühren und autoklavieren
Hypertoner Puffer	20 mM Hepes 1,5 mM MgCl ₂ 10 mM KCl 420 mM NaCl 0,2 mM EDTA ad 100 ml mit H ₂ O, pH 7,9

Hypotoner Puffer	10 mM Hepes 1,5 mM MgCl ₂ 10 mM KCl 0,5 % IGEPAL CA-630 ad 100 ml mit H ₂ O, pH 7,9
Glycerol-Puffer	20 mM Hepes 100 mM KCl 0,2 mM EDTA 20 % Glycerol ad 100 ml mit H ₂ O, pH 7,9
KH ₂ PO ₄ -Puffer 50 mmol/l, pH 6,8	13,6 g KH ₂ PO ₄ wasserfrei 1600 ml H ₂ O mit 1 mol/l KOH auf pH 6,8 einstellen mit H ₂ O auf 2000 ml auffüllen
Mobile Phase für HPLC	400 ml Methanol 600 ml KH ₂ PO ₄ -Puffer
TBA-Lösung, 42 mol/l	0,6 g 4,6-dihydroxy-2-thiopyrimidin 80 ml H ₂ O, bei 50 - 55 °C lösen auf 100 ml mit H ₂ O auffüllen

5.3 Verbrauchsmaterialien

Materialbezeichnung

Alzet® osmotische Pumpen
Braunüle BD Venflon™ Pro
Kryoröhrchen
Omnifix®-F1

Firma

Charles River, Sulzfeld, Deutschland
BDVialon™ Biomaterial
Nunc™, Roskilde, Dänemark
Braun, Melsungen, Deutschland

PCR-Gefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pilca Enthaarungscreme	GlaxoSmithKline, Bühl, Deutschland
Pipettenspitzen, steril	Star Lab, Ahrensburg, Deutschland
Ultraschallkontaktgel	Sonogel, Bad Camberg, Deutschland
SuperFrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Teningen, Deutschland
Ethicon®, Perma-Hand-Seide	Ethicon, Norderstedt, Deutschland
96-well-Immunoplatte	Nunc™, Roskilde, Dänemark

5.4 Geräte und Zubehör

Digitalkamera Coolpix 995	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Brutschrank	Memmert, Schwabach, Deutschland
EKG cardiofax GEM	Nihon Kohden, Rosbach, Deutschland
ELISA-Reader, Model 550	Bio-Rad, München, Deutschland
Gel Doc 2000	Bio-Rad, München, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad, München, Deutschland
HPLC Pump 2248	Pharmacia LKB, Freiburg, Deutschland
iCycler	Bio-Rad, München, Deutschland
Isofluran Dräger Vapor 2000	Drägerwerke, Lübeck, Deutschland
Kleintierbeatmungsgerät Mouse	UGO BASILE biological research apparatus, Comerio, Italien
Ventilator	Ika Labortechnik, Staufen, Deutschland
Magnetrührer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mastercycler Gradient	FST Medizintechnik, Bad Oeynhausen, Deutschland
Mikrokoagulator	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Mikroskop Ax	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Mikroskop OPM11-FR	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop WILD M3B	Reihert-Jung, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom Hn 40	Philips Whirlpool, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Photometer, Ultraspec 3000	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer	Heraeus, Hanau, Deutschland
Trockenschrank	Toshiba, Neuss, Deutschland
Ultraschallgerät	Janke & Kunkel GmbH, Staufen, Deutschland
UltraTurrax	Pharmacia LKB, Freiburg, Deutschland
UV Detektor Uvicord VW 2251	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Waage	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Biofuge fresco	

5.5 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Tiere wurden ihren Bedürfnissen entsprechend in klimatisierten Isolatoren mit einer konstanten Temperatur von 20 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50 - 70 % untergebracht. Die Käfige boten genügend Raum, um artgemäßes Verhalten zu ermöglichen, und wurden zweimal pro Woche gewechselt.

C57/Bl6 Mäuse	Harlan – Winkelmann, Borchon, Deutschland
eNOS ^{-/-} Mäuse	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
p50 ^{-/-} Mäuse	Steve Gerondakis, The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Parcville, Victoria, Australien
Einstreu	Harlan – Winkelmann, Borchon, Deutschland
Handschuhe	Kimberlay – Clark, Zaventem, Belgien
Nagerfutter	Harlan – Winkelmann, Borchon, Deutschland
Käfige	Ehret, Emmendingen, Deutschland
OP-Maske	Lohmann & Rauscher, Rengsdorf, Deutschland
Überschuhe	Panep, Rosice, Tschechien
Isolator	Scanbur, Karlslunde, Dänemark

6. Methoden

6.1 Tieroperationen

6.1.1 *Methode der Ischämie/Reperfusion*

Bei der Ischämie/Reperfusion, die als Modell für einen akuten Infarkt mit anschließender Wiederversorgungsphase dient [71], wurden die Tiere zunächst mit Ether in einem Glas-Ethertopf unter ständiger Kontrolle der Vitalfunktionen narkotisiert und anschließend mit einer Braunüle intubiert und an ein Kleintierbeatmungsgerät angeschlossen. Die Extremitäten wurden auf einer Operationsplatte mit integriertem Heizteil in Rückenlage fixiert. Die Narkose wurde mit 0,8 % Isofluran und 100 % Sauerstoff vertieft und nach Anbringen der Elektroden wurde ein EKG präoperativ aufgezeichnet.

Nach dem Hautschnitt auf der Höhe des 4. Interkostalraumes im Thorax und nach dem Trennen des Musculus cutaneus trunci wurden die Musculi serrati dorsales und ventrales entlang der Faserrichtung getrennt. Kapilläre Blutungen wurden durch Kompression mit Saugtupfern gestillt, anhaltende Blutungen wurden mit einem Mikrokoagulator verödet.

Der Thorax wurde durch Auftrennen des Musculus pectoralis profundus im vierten Interkostalraum eröffnet. Dieser konnte mit Hilfe eines modifizierten Rippenspreizers offen gehalten werden.

Die Arterie wurde 1 mm apikal des linken Vorhofes umstoßen und mit Seidenfaden ligiert. Um das für die Reperfusion notwendige Wiedereröffnen der Ligatur nach 30 Minuten zu ermöglichen, wurde ein 1 mm langes Polyethylen-Schlauchstück dem Knoten unterlegt.

Während der 30-minütigen Ischämie wurde die Körpertemperatur auf physiologischen 37 °C gehalten und die freiliegende Thoraxwunde mit Kochsalzlösung feucht gehalten. Nach 30 Minuten wurde die Ligatur wieder geöffnet und der Polyethylenschlauch entfernt. Die erneute Blutfüllung der Arterie und auch die Durchblutung des vorher ischämischen Bereiches zeigten die Reperfusion des Gewebes durch Farbveränderung

an. Der Seidenfaden wurde nicht entfernt, um nach 24 h Reperfusion zum Zwecke einer Evans-Blue-Färbung wieder das gleiche Atrial erneut zu verschließen.

Der Thoraxverschluss erfolgte durch Adaptation der Muskelschichten. Die Haut wurde durch Klammern verschlossen. Die Tiere erhielten zur postoperativen Analgesie Buprenorphin (Temgesic®, ESSEX PHARMA, München) in einer Dosierung von 0,1 mg/kg KM. Die Isofluransedierung wurde nach vollständigem Verschluss der Haut völlig abgesetzt und der Maus wurde bis zum Einsetzen der Spontanatmung weiterhin Sauerstoff zugeführt.

6.1.2 Infarktfärbung und Probengewinnung

Nach 24-stündiger Reperfusion wurden die Tiere wieder unter Inhalationsanästhesie mit Isofluran narkotisiert und thoraktomiert. Anschließend wurde der Vicrylfaden verschlossen und 0,5 ml 5 %iger Evans-Blue-Lösung in den rechten Ventrikel injiziert. Die perfundierten Herzareale verfärbten sich blau, während der ischämische Bereich ungefärbt blieb. Als nächstes wurde das Tier durch eine KCl-Injektion getötet, das Herz herauspräpariert und mehrmals mit NaCl-Lösung gespült. Nach Einbetten in TissueTec wurde es zum besseren Schneiden für eine halbe Stunde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Im nächsten Schritt wurde das gefrorene Herz mittels Skalpell vom Apex bis zur Basis in fünf gleich dicke Scheiben geschnitten und in einer Kochsalzlösung bis zum vollständigem Lösen des Tissue Tec inkubiert.

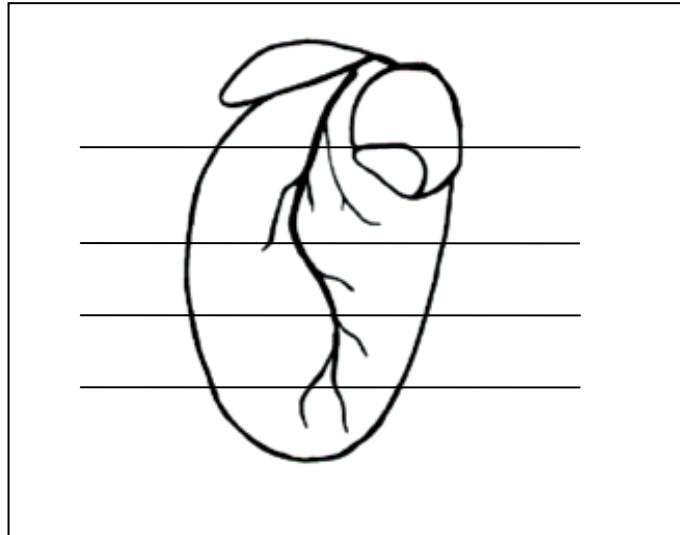


Abbildung 6:

Schnittebenen durch das gefrorene Herz nach einer Evans-Blue-Färbung.

Um in dem ischämischen Gebiet (area at risk) das geschädigte vom intakten Gewebe abzugrenzen, wurden die Schnitte in einer 2 %igen TTC-Lösung (2, 3, 5-Triphenyltetrazolium-Chlorid) 10 Minuten lang bei 37 °C in einem Thermoschüttler gefärbt. Bei dieser Reaktion wandelt sich im vitalen Gewebe das TTC durch oxidative Phosphorylierung durch mitochondriale Dehydrogenase in den roten Farbstoff 1, 2, 5-Triphenylformazan um. Dieses Gebiet färbt sich demnach rot, während das abgestorbene Gewebe weiß bleibt.

Nach dieser Färbung wurden die Schnitte einzeln in einer 96-well-Platte, die vorher mit einer 10 %igen Formalinlösung gefüllt wurde, bis zur Auswertung aufbewahrt.

Um die Färbung planimetrisch auszuwerten, wurden von den Herzscheiben jeweils von beiden Seiten digitale Aufnahmen angefertigt und diese anschließend mit einer elektrischen Waage gewogen.

Mittels einer Planimetrie-Software (ScionImage) konnten in den digitalen Fotografien die Flächen durch manuelles Umfahren der Konturen nach der unterschiedlichen Färbung ermittelt werden. Die Bilder wurden stets noch einmal mit den tatsächlichen Herzscheiben verglichen. Dazu wurden die Herzscheiben unter einem Vergrößerungsglas betrachtet, um möglichst genaue Ergebnisse zu erhalten. Außerdem wurden alle Messungen innerhalb von 24 h nach der Färbung durchgeführt, um Verfälschungen durch Verblässen oder Verschwimmen der Farben zu vermeiden.

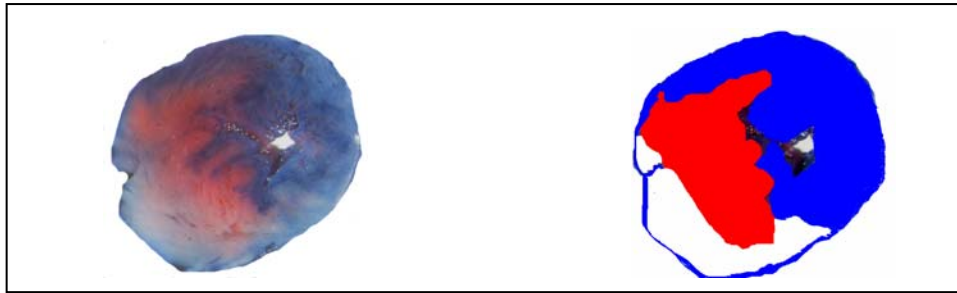


Abbildung 7:

Abbildung einer gefärbten Herzscheibe und die dazugehörige Auswertung:

Blau symbolisiert das perfundierte, Rot das gefährdete und Weiß das infarzierte Gebiet.

Anschließend wurde aus diesen Daten das Verhältnis der Ischämiefläche zur area at risk nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Infarktgröße} = (A1 \times WT1) + (A2 \times WT2) + (A3 \times WT3) + (A4 \times WT4) + (A5 \times WT5)$$

A = durch die Planimetrie bestimmte Fläche des infarzierten Gewebes

WT = Gewicht der Herzscheibe

$$\text{Anteil des Infarktgebietes am gesamten Herzen in \%} = (WT \text{ Infarkt} / WT \text{ Herz}) \times 100$$

$$\text{Anteil des ischämischen Gebietes am gesamten Herzen in \%} = (WT \text{ Herz} - WT \text{ des blau gefärbten Bereiches}) / WT \text{ Herz}$$

6.1.3 Modell des Myokardinfarkts

Die Operationsmethode des Myokardinfarkts verlief nach einer ähnlichen Technik wie bei Ischämie/Reperfusion. Dabei wurde die Arterie ligiert und der Seidenfaden jedoch dauerhaft fest verknotet. Die Auswirkung des Myokardinfarkts, in dessen Folge eine Herzinsuffizienz entwickelte, wurde bei dieser Methode über einen längeren Zeitraum beobachtet.

6.2 Echokardiographische Bildgebung

6.2.1 Durchführung

Für die transthorakale Echokardiographie wurden die Tiere zunächst an rechts- und linkslateraler Thoraxwand mittels einer Enthaarungscreme enthaart und anschließend über eine Gesichtsmaske die Inhalationsnarkose eingeleitet. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde eine Mindestdosis von Isofluran (0,8 – 1,5 %, Abbot) verabreicht. Nach Narkoseinduktion wurden die Mäuse in Rückenlage an den Extremitäten fixiert und auf den enthaarten Thorax Ultraschallkontaktgel aufgetragen.

Für die echokardiographische Untersuchung wurde ein Echokardiographiesystem von Toshiba verwendet und in 2D-Mode und M-Mode unter Verwendung eines 14MHz-Linearschallkopfs durchgeführt. Für Zoom-Bildgebung wurde die 2D-Bildakquisition mit der höchstmöglichen Bildrate durchgeführt und die Bilder wurden auf der Festplatte des Systems gespeichert. Bei der parasternalen 2D-Longachsenansicht wurde eine Mindesttiefe von 2 cm eingehalten und der linke Ventrikel in der Ebene der Aorten- und Mitralklappe dargestellt. Die Kurzachsenansicht wurde auf Höhe der Papillarmuskeln aufgezeichnet. Anschließend wurden im M-Mode auf dieser Bildebene die enddiastolischen (EDD) und endsystolischen (ESD) Durchmesser des linken Ventrikels mit einer Zeitbasis von 100 mm/s bestimmt.

6.2.2 Echokardiographische Analyse

Die echokardiographischen Aufnahmen wurden verblindet, d. h. ohne Kenntnis der Behandlung, offline ausgewertet. Im 2D-Mode der Kurzachsenansicht wurden die endokardialen Grenzen jeweils im endsystolischen sowie im enddiastolischen Zustand durch Umfahren bestimmt. Bei jedem Herzen erfolgte die Ausmessung von drei Aufnahmen mit anschließender Ermittlung der endsystolischen (der kleinsten) und der enddiastolischen (der größten) Fläche der linken Kammer. Durch die Kenntnis dieser Flächen konnte folglich die Änderung der linksventrikulären fraktionellen Flächen berechnet werden $[(EDA - ESA)/EDA]$. Im M-Mode der Kurzachsenansicht wurden die

endsystolischen und enddiastolischen Durchmesser ermittelt und daraus die linksventrikuläre fraktionelle Verkürzung errechnet.

6.3 Hämodynamik

Die hämodynamischen Messungen bei Mäusen erfolgten unter Isofluran-Narkose. Dabei konnten mit Hilfe eines Katheters, der über die rechte Arteria carotis im linken Ventrikel platziert wurde, die Herzfrequenz, die Druckänderung über die Zeit (dP/dt_{\max} bzw. dP/dt_{\min}) und der linksventrikuläre systolische (LVSP) bzw. enddiastolische Druck (LVEDP) ermittelt werden.

6.4 Organentnahme

Für die Organentnahme wurden die Tiere zunächst durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde der Thorax eröffnet und das Blut mittels einer 1-ml-Spritze entnommen. Das Herz und die Lunge wurden herauspräpariert und in einer NaCl-Lösung gesäubert. Nachdem der rechte Ventrikel vom restlichen Herzen abgetrennt wurde, wurden die einzelnen Teile gewogen und das Herz in vier gleich große Ringe geschnitten. Die Herzspitze, die Herzbasis sowie der rechte Ventrikel wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren, der Histologiering in Formalinlösung fixiert und der Immunhistologiering in Isopentan bei -20 °C eingefroren. Das Blut wurde 5 Minuten bei 3500 Umdrehungen zentrifugiert und anschließend im flüssigen Stickstoff gelagert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Herzteile abgesehen vom Histologiering bei -80 °C gelagert.

6.5 Infarktgrößenbestimmung

Um in $7\text{ }\mu\text{m}$ dünnen Gewebeschnitten die Infarktgröße zu bestimmen, wurden diese erst einmal in einer Xylol-Ethanol-Reihe entparaffiniert und anschließend in einer Picosiriusrot-Lösung eingefärbt. Die Präparate wurden in einer 2,5-fachen Vergrößerung über eine Kamera, die mit dem Mikroskop verbunden wurde, aufgenommen und mit Hilfe des Programms ImageJ planimetrisch ausgewertet. Der so

ermittelte epi- und endokardiale Narbenumfang sowie der Umfang des linken Ventrikels dienten zur Ermittlung der prozentualen Infarktgröße.

6.6 Kollagengehaltsbestimmung

Bei der Kollagen-Volumen-Fraktion mittels Hellfeldmikroskopie wurden die Formalin-fixierten, mit Picrosiriusrot gefärbten 7- μ m-Paraffinschnitte zunächst durch einen rot absorbierenden Blaufilter mittels einer Kamera in einer 10-fachen Vergrößerung aufgenommen. Der identische Bildausschnitt wurde anschließend im polarisierten Licht in Graustufen eingelesen und die Helligkeitswerte der einzelnen Pixel wurden digital subtrahiert [72].

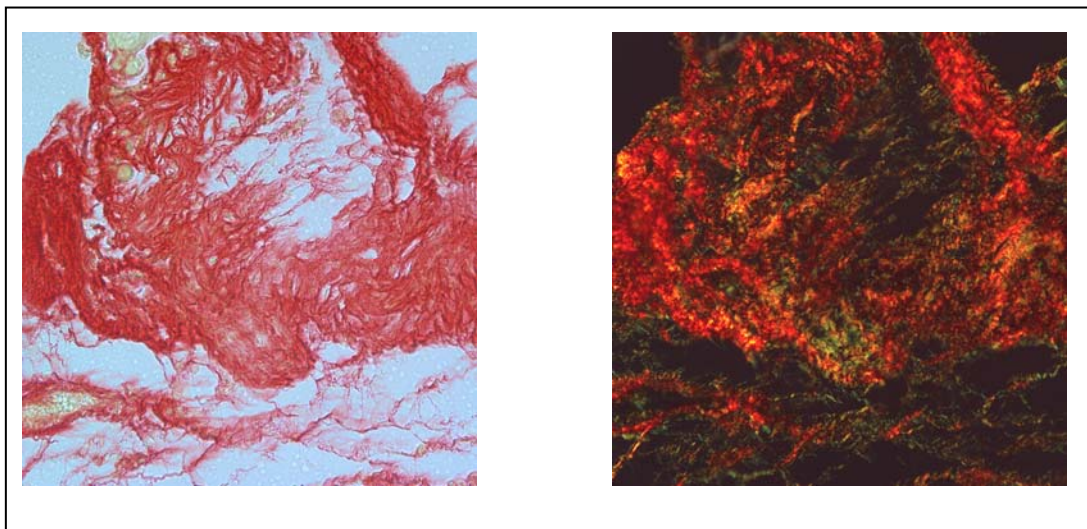


Abbildung 8:

Aufnahme einer mit Picrosiriusrot gefärbten Herznarbe mit rot absorbierendem Blaufilter und polarisiertem Licht.

6.7 RNA-Extraktion

Gesamt-RNA wurde aus schockgefrorenen Gewebeproben mit der von Chomczynski und Sacchi [73] beschriebenen Guanidiniumisothiocyanat-Methode wie folgt extrahiert: 100 mg Gewebe wurden in 1 ml Trizol für einige Sekunden mit einem Homogenisator (Ultra Turrax) zerkleinert; 200 μ l Chloroform wurden hinzugefügt und das Homogenat 15 s kräftig geschüttelt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten wurde bei 12.000 x g für

15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, bei dem sich das Homogenat in drei Phasen auftrennte. Die RNA war in der wässrigen Phase enthalten, die DNA in der organischen und in der Interphase. Die Proteine befanden sich in der organischen Phase. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Präzipitation der RNA erfolgte mit 1000 µl Isopropanol und einer weiteren 10-minütigen Zentrifugation bei 12.000 x g. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 75 % Ethanol mehrmals gewaschen und wieder pelletiert. Das erhaltene RNA-Pellet wurde luftgetrocknet und in RNA-freiem mit DEPC behandeltem Wasser gelöst. Die gelöste RNA wurde nun bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

6.8 Reverse Transkription

Zunächst wurden 1000 ng RNA mit 1µl Desoxynukleotiden (10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 1µl Random Hexamer in einem Volumen von 10 µl 5 Minuten bei 65 °C inkubiert und anschließend auf Eis gegeben. Nach diesem Reaktionsschritt, der die Anlagerung der Random-Primer an die RNA bewirkt, wurde folgende Lösung angesetzt (angegeben sind jeweils die benötigten Volumina pro Probe): 4 µl Enzympuffer, 1 µl RNase-Inhibitor (RNAasin), 4 µl steriles H₂O. 9 µl dieser Lösung wurden nun mit dem Reaktionsansatz vermischt und dieser für 2 Minuten auf 25 °C temperiert. Anschließend wurde 1 µl Reverse Transkriptase hinzugefügt und der Ansatz 10 Minuten bei 25 °C, 50 Minuten bei 42 °C und 15 Minuten bei 70 °C zum Inaktivieren der reversen Transkriptase inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl RNaseH und anschließender 20-minütiger Inkubation bei 37 °C beendet. Der Reaktionsansatz wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

6.9 Quantitative PCR mittels der TaqMan-Technologie

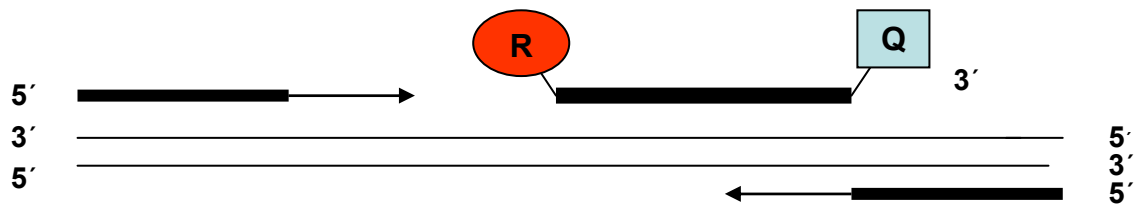
6.9.1 Grundlagen

Beim TaqMan-Verfahren wird die bei den einzelnen PCR-Zyklen entstandene Produktmenge mittels eines Fluoreszenz-Detektionssystems bestimmt, wodurch die Menge des ursprünglich eingesetzten Templates quantifiziert werden kann.

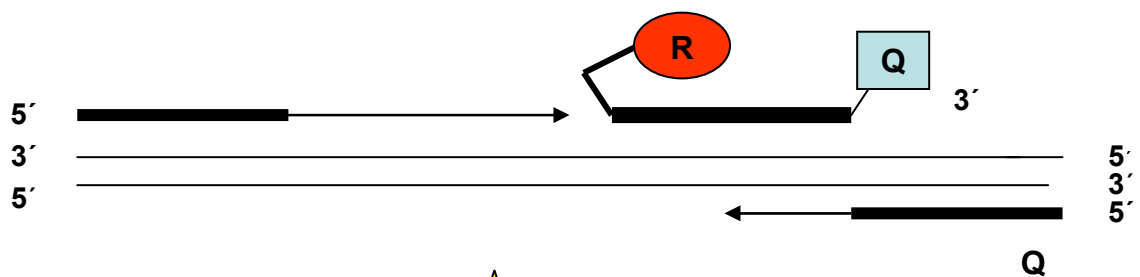
Der PCR-Ansatz enthält zusätzlich zu den Primern eine Oligonukleotid-Sonde, die sich spezifisch an eine Zielsequenz zwischen den Primern anlagert. Die Sonde trägt am 5'-Ende einen Reporterfarbstoff (FAM oder VIC) und am 3'-Ende den Quencherfarbstoff TAMRA. Solange die Oligonukleotidsonde intakt ist, wird die Fluoreszenzenergie des Reporterfarbstoffes auf den Quencher übertragen (Fluorescence Resonance Energy Transfer = FRET), wodurch eine Fluoreszenzemission unterdrückt wird.

Während der Elongationsphase eines jeden PCR-Zyklus spaltet die *Taq*-Polymerase aufgrund ihrer 5'→3'-Exonuklease-Aktivität die Sondenmoleküle. Dadurch wird die Quenchung des Reporterfarbstoffes aufgehoben, so dass eine Fluoreszenz detektiert werden kann. Während jeder PCR-Runde werden weitere Sondenmoleküle gespalten. Die gemessene Zunahme der Fluoreszenz ist während der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion direkt proportional zur Menge des entstandenen Amplifikats, welche wiederum proportional zur eingesetzten Template-Menge ist.

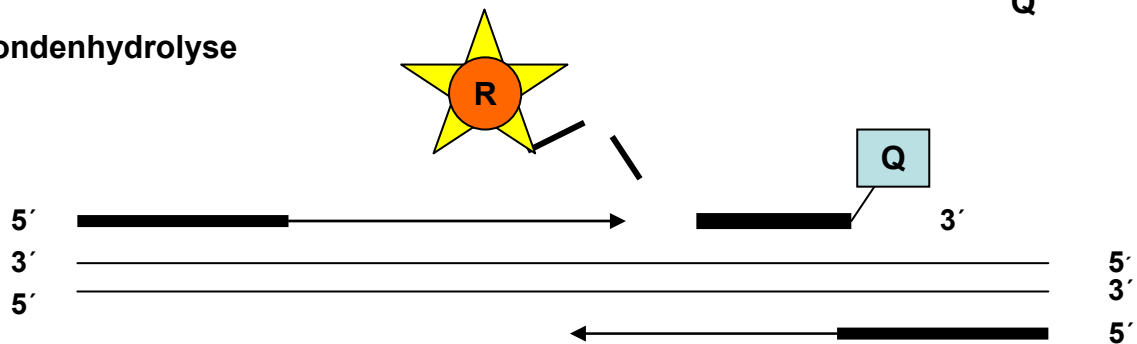
Anlagerung der Sonde und der Primer



Primer-Extension und Sondenverdrängung



Sondenhydrolyse



Vollständige Synthese des PCR-Produktes und Trennung des Farbstoffes

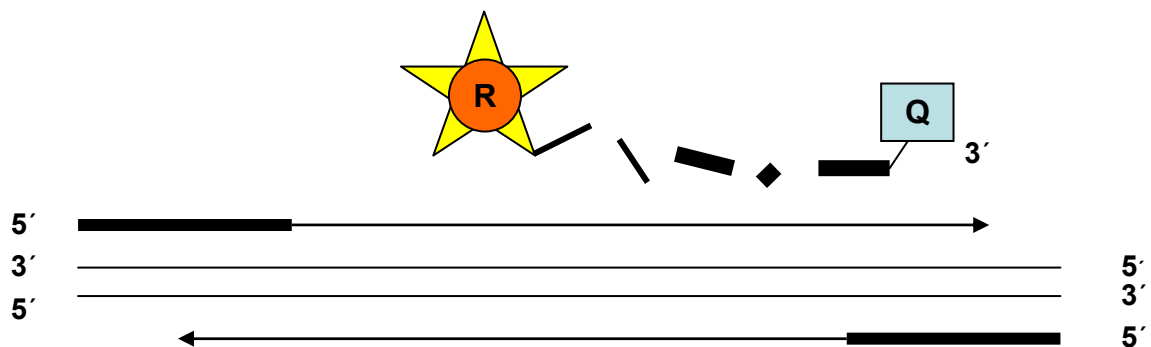


Abbildung 9:

Mechanismus einer Real-Time-PCR mit TaqMan-Sonde (modifiziert nach Applied Biosystems).

Zur Quantifizierung der Template-Konzentration in einer Probe wird die Zykluszahl bestimmt, bei der das Fluoreszenzsignal einen festgelegten Schwellenwert überschreitet (C_T -Wert, threshold cycle). Dieser Schwellenwert ist definiert als das Zehnfache der Standardabweichung der Fluoreszenzsignale in den Zyklen 3 bis 15. Der C_T -Wert ist umso niedriger, je höher die Template-Konzentration in der Probe ist.

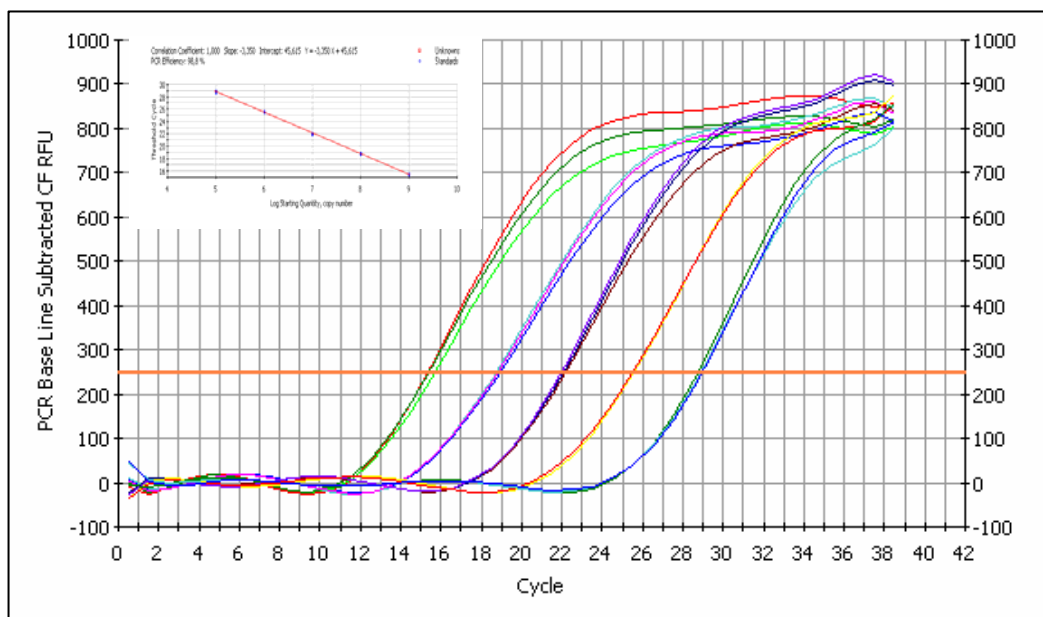


Abbildung 10:

Verlauf einer Real-Time-PCR mit TaqMan-Sonde; der Schnittpunkt der Zykluszahl mit der C_T -Linie ist umgekehrt proportional zur Genexpression.

6.9.2 TaqMan-PCR-Bedingungen

Die PCR-Stammlösungen bestanden aus 12,5 μ l SuperMix, Wasser und den entsprechenden Lösungen von Primern und Sonde, so dass sich ein Gesamtvolumen von 20 μ l ergab. Der Supermix von BioRad besteht aus iTaqDNA-Polymerase, $MgCl_2$, dNTPs sowie aus optimierten Pufferbestandteilen.

20 μ l PCR-Stammlösung, 5 μ l des Standards, bzw. die zu quantifizierende cDNA-Probe, bzw. Wasser (Negativkontrolle) wurden in die Kavitäten einer MicroAmp Optical 96-well-Platte pipettiert.

In der TaqMan-PCR wurde folgendes Temperaturprofil für alle untersuchten Transkripte angewendet:

PCR-Schritt	Zeit (sec)	Temperatur (°C)	Zyklen
Spaltung mit UNG	120	50	-
Anfangsdenaturierung	600	95	-
Denaturierung	15	95	40
Annealing u. Elongation	60	60	

Tabelle 1:

PCR-Protokoll bei der Durchführung einer Real-Time-PCR.

6.9.3 Plasmid-Standard für die Real-Time-PCR

Die Plasmide wurden mittels TOPO TA Cloning®-Kit hergestellt. Zunächst wurde die cDNA mit spezifischen Primern amplifiziert. Dazu wurden 2 µl cDNA mit 10 µl SuperMix, 1 µl ABI Expression Assay und H₂O angesetzt. Folgendes Thermoprofil wurde in einem Thermocycler benutzt: 3 Minuten bei 95 °C, 30 sec bei 95 °C, 30 sec bei 60 °C, 30 sec bei 72 °C (35 Zyklen) und abschließend einmalig 10 Minuten bei 72 °C. Die PCR-Produkte wurden anschließend in einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht isoliert. Die DNA wurde mittels QIAquick-Gel-Extraction-Kit aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt.

Anschließend wurde die DNA in einen pCR 2.1-TOPO-Vektor ligiert. Dafür wurden 3 µl DNA mit 3 µl TOPO-Cloning-reaction-mix (bestehend aus je 1 µl Salzlösung, sterilem H₂O und TOPO-Vektor) für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann 2 µl der Lösung in ein Gefäß mit One Shot Competent E.coli gegeben.

Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis und 30 sec bei 42 °C wurden 250 µl SOC-Medium dazugegeben und die Suspension für 1 h bei 37 °C unter Durchmischung inkubiert. Danach wurden 50 µl der Suspension auf vorgewärmte, mit je 40 µl IPTG (100 mM) und X-Gal (40 mg/ml) präparierte Agarplatten geimpft. Die Platten wurden über Nacht bei

37 °C inkubiert und am nächsten Morgen die Kolonien nach blauer bzw. weißer Farbe selektiert. Nur die weißen Kolonien wurden auf neue Platten angeimpft. Die Transformation der positiven Klone wurde durch PCR (mittels Forward und Reverse M13-Primer) und nachfolgende Gelelektrophorese überprüft. Nur Klone, die ein Genprodukt der erwarteten Länge beinhalten, wurden über Nacht in 4 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin bei 37 °C geschüttelt.

Mittels Minipräparation wurden die positiven Plasmide extrahiert und aufgereinigt, die Insertion der zu amplifizierenden DNA mit einem Agarosegel überprüft.

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde anschließend photospektrometrisch bei OD₂₆₀ bestimmt und Standard-Verdünnungsreihen (10⁹-10⁴ Kopien/µl) wurden mittels H₂O hergestellt. Die entsprechende Anzahl Plasmidkopien wurde unter der Annahme, dass 1 µg der 1000 bp DNA 9,1x10¹¹ Molekülen entsprechen, errechnet.

6.10 Immunhistochemie

6.10.1 Grundlagen

Um in Gewebeschnitten bestimmte Strukturen bzw. ihre Verteilung nachzuweisen, werden diese mit spezifischen Antikörpern inkubiert. Diese Antikörper werden im Tiermodell hergestellt und binden spezifisch an die Antigene (Epitope) interessierter Strukturen. Zur Sichtbarmachung der Antigen-Antikörper-Bindung verwendet man einen zweiten Antikörper, dessen Antigen Immunglobuline der Tierart sind, aus der der primäre Antikörper gewonnen wurde. Obwohl dieser Antikörper mit einem Farbstoff versehen ist, reicht dieses Signal zur Detektion nicht aus. Zur weiteren Verstärkung behilft man sich mit einer ABC-Methode (Avidin–Biotin-Complex). Dabei trägt der sekundäre Antikörper ein Biotin-Molekül, das von Avidin gebunden wird. Avidin besitzt mehrere Biotin-Bindungsstellen, d. h., es kann mehrere ebenfalls Biotin tragende Markermoleküle binden, z. B. biotinylierte Meerrettich-Peroxidase. Wird die Peroxidase als Reporter-Molekül verwendet, so wird schließlich im eigentlichen Färbeschritt DAB (3,3'-Diaminobenzidin) zugegeben, welches unter Einfluss der Peroxidase ein braunes Endprodukt bildet. Vor der Markierung und Färbung wird das zu untersuchende Gewebe bei Verwendung von Meerrettich-Peroxidase zunächst in 3 %igem

Wasserstoffperoxid eingelegt, um die endogene Peroxidase zu blockieren, die sonst das Signal verfälschen würde. Eine weitere Verfälschung durch unspezifische Bindung der Antikörper wird dadurch umgangen, dass das Gewebe vor der Antikörperbindung in einer Blockierungslösung inkubiert wird, z. B. in Serum der Spezies, aus welcher der sekundäre Antikörper gewonnen wurde.

Um die Schnitte zu entparaffinieren, wurden diese in Xylol und in einer Xylol-Ethanol-Lösung 1:1 inkubiert. Anschließend wurde die endogene Peroxidase durch zehninminütige Behandlung mit methanolischer Wasserstoffperoxidlösung geblockt und in einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 90 %, 50 %) inkubiert.

6.10.2 Durchführung

Die in einer Formalinlösung fixierten Schnitte wurden zunächst einem Entwässerungsverfahren unterzogen und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden aus diesen Herzen 5 µm dünne Querschnitte mit Hilfe eines Mikrotoms angefertigt, auf einen Objektträger gezogen und über Nacht bei 60 °C fixiert.

Um die Schnitte zu entparaffinieren, wurden diese in einer Xylol- und absteigenden Alkoholreihe behandelt, hydriert und in PBS eingelegt. Daraufhin wurden sie zweimal 7 Minuten in einer verdünnten Epitop-Entmaskierungslösung bei 95 - 96 °C gekocht und 10 bis 20 Minuten abgekühlt. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte in einer 3 %igen Wasserstoffperoxidlösung inkubiert und anschließend mehrmals mit 0,3 %igem Tween 20 in PBS gespült. Nach 30-minütiger Behandlung mit 5 % Normal-Rabbit Serum Vector in 1x PBS/0,3 % Tween 20-Lösung zur Blockierung der unspezifischen Antikörperbindungen wurden die Schnitte mit dem spezifischen primären Antikörper in einer feuchten Kammer im Kühlraum über Nacht inkubiert. Als Kontrolle wurden die entsprechenden Schnitte mit einem unspezifischen Antikörper behandelt. Am nächsten Tag wurde der primäre Antikörper mit 1x PBS/0,3 % Tween 20-Lösung ausgespült und ein sekundärer Antikörper zur Verstärkung des Signals auf das Gewebe pipettiert. Nach einer halben Stunde wurde der sekundäre Antikörper ebenfalls mit 1x PBS/0,3 % Tween 20-Lösung entfernt und die Schnitte für 30 Minuten mit Biotin-ABC-Reagenz in einer feuchten Kammer behandelt. Nach wiederholtem Waschen mit 1x PBS/0,3 % Tween 20-Lösung folgte die Entwicklung mit DAB-Reagenz

unter Lichtausschluss. Im letzten Schritt wurden die Schnitte wieder in der aufsteigenden Alkoholreihe enthellt und mit Enhellan eingebettet. Nun konnte die spezifische Färbung unter dem Mikroskop betrachtet werden.

6.11 Gewinnung der nukleären und zytosolischen Proteine

Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren wurde in nukleären Proteinen bestimmt. Zur Gewinnung dieser Proteine wurde ein Stück des Mäuseherzens im hypotonen Puffer mit DTT und PMSF homogenisiert und anschließend 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde das zytosolische Protein in ein neues Gefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Im Pellet befand sich das nukleäre Protein, welches im hypertonen Puffer mit DTT und PMSF gelöst und dann bei 4 °C 30 Minuten geschüttelt wurde. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Protein mit Glycerol gemischt und sofort im flüssigen Stickstoff gelagert.

6.12 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Bradford bestimmt [74]. Hierbei handelt es sich um eine kolorimetrische Methode, d. h. der Proteinbestimmung liegt eine Farbreaktion zu Grunde. Die Farbreaktion beruht auf der spezifischen, hydrophoben und elektrostatischen Bindung des Trimethylmethan-Farbstoffs Coomassie-Brilliantblau G250 an Argininreste bzw. N-terminale Aminogruppen der gelösten Proteine. Bei der Bildung des Farbstoff-Protein-Komplexes wird vor allem die anionische Form stabilisiert, wobei es im sauren Milieu zu einer Absorptionsverschiebung von 465 nm zu 595 nm kommt. Diese Nachweismethode ist sehr sensitiv und liegt unter optimalen Bedingungen bei einer Nachweisgrenze von unter 1 µg Protein.

Für die Proteinbestimmung wurde das Bradford-Reagenz von BioRad verwendet. Zu 2 µl Probe wurden 998 µl Bradford-Reagenz (1:4 verdünnt mit H₂O) gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde anschließend in Einmalküvetten bei 595 nm photometrisch gemessen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Eichgerade erstellt, wobei als Standard Rinderalbuminserum (1 mg/ml BSA) verwendet wurde.

6.13 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

6.13.1 Grundlagen

Eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren aus nukleären Proteinen stellt der ELISA dar.

Dafür werden Platten verwendet, auf deren Oberfläche Oligonukleotide gegen den Transkriptionsfaktor verankert wurden. Nachdem das nukleäre Protein auf die Platte aufgetragen wird, kommt es zu einer Bindung zwischen dem gesuchten Transkriptionsfaktor und dem immobilisierten Oligonukleotid. Der primäre Antikörper, der anschließend hinzugefügt wird, erkennt das Epitop auf der Untereinheit des Faktors und wird nur erkannt, wenn der Transkriptionsfaktor aktiviert und an die DNA gebunden ist. Der HRP-konjugierte sekundäre Antikörper ermöglicht eine sensitive kalorimetrische Bestimmung, die leicht spektrophotometrisch quantifiziert werden kann.

6.13.2 Durchführung

Zur Erstellung einer Standardkurve wurde aus dem rekombinanten Protein eine Verdünnungsreihe erzeugt. Anschließend wurde in jede Kavität einer Platte Bindungspuffer vorgelegt und die Proben, die vorher in Lösungspuffer verdünnt wurden, hinzugefügt. Die Standardproben sowie die Negativprobe wurden nach dem gleichen Verfahren behandelt. Nach der Inkubation und mehrmaligem Waschen folgte eine Behandlung mit dem primären Antikörper. Nachdem der überschüssige, nichtgebundene Antikörper ausgewaschen wurde, wurde der sekundäre HRP-konjugierte Antikörper hinzugefügt. Beim nächsten Schritt wurde die Detektionslösung hinzupipettiert. Die Farbreaktion erschien stets innerhalb der ersten 2 bis 10 Minuten und konnte dann mit der Stopplösung unterbrochen werden. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines ELISA-Lesegerätes bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm.

Die Messung der einzelnen Proben sowie der Standardkurve erfolgte in Doppelbestimmung. Die Auswertung wurde mit der Software Microsoft Excel durchgeführt.

6.14 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

6.14.1 Grundlagen

Der Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) dient zum Nachweis von DNA-bindenden Proteinen wie dem Transkriptionsfaktor NF- κ B. Hierbei werden Proteine mit einer radioaktiv markierten DNA-Sequenz inkubiert und diese dann auf ein natives Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Mittels eines elektrischen Feldes wandern die DNA-Protein-Komplexe entsprechend ihrer Größe, wobei die DNA-Protein-Komplexe langsamer wandern als die freie DNA.

Aufgrund der radioaktiv markierten DNA können die Banden im Gel durch Auflegen eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden.

6.14.2 Durchführung

Zunächst wurde das doppelsträngige Oligonukleotid mit Hilfe der Polynukleotidkinase aus dem Bakteriophagen T4 radioaktiv markiert. Das Enzym katalysiert den Transfer der terminalen radioaktiven Phosphatgruppe von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ auf die 5'-OH Enden der doppelsträngigen DNA und kann zusätzlich eine 5'-terminal stehende nicht radioaktive Phosphatgruppe gegen den radioaktiven Phosphatrest aus dem $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ austauschen. Das überschüssige freie $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ wird anschließend mittels Säulen entfernt.

Dafür wurde das Reaktionsgemisch, bestehend aus 1 μl doppelsträngigem Oligonukleotid, 5 μl $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, 5 μl 10x Kinase-Puffer, 2 μl T4 und Wasser, 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reinigung des markierten Oligonukleotids erfolgte mit MicroSpin G25-Säulen.

Für den Nachweis der Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B wurden anschließend 10 μg des nukleären Proteins in 20 μl Reaktionsvolumen mit Shift Puffer, 0,5 mg/ml BSA, 5 mM DTT, 100 μM Poly(dIdC) und radioaktiv markierter Oligonukleotidsonde für 30 Minuten inkubiert. Die Proben wurden auf ein 5 %iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen und in Tris-Borsäure-EDTA-Puffer aufgetrennt. Im

nächsten Schritt wurde das Gel auf einem Filterpapier unter Vakuum getrocknet und mindestens zwei Tage mit einem Röntgenfilm bei -80 °C exponiert.

6.15 MDA (Malondialdehyd)-Messung mittels HPLC

6.15.1 Grundlagen

Zur Quantifizierung der Lipidperoxide und der Aktivität freier Radikale verwendet man die HPLC-Methode in Kombination mit dem TBA-Test, bei dem die Konzentration von Malondialdehyd bestimmt wird [75].

Serum-Lipidperoxide werden in einer Phosphatlösung in der Wärme hydrolysiert. Malondialdehyd, eines der Hydrolyseprodukte, reagiert anschließend mit Thiobarbitursäure unter Bildung einer Schiffschen Base aus einem Molekül MDA und zwei Molekülen Thiobarbitursäure. Dieser Komplex wird auf eine Nova Pak C18 Stahl-Säule aufgetragen und nach dem Prinzip der Reversed Phase HPLC mit einer mobilen Phase aus Acetonitril und Tetrahydrofuran in Phosphatlösung bei 532 nm quantifiziert. Tetrahydropropan dient dabei als Standard.

Die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) ist eine Sonderform der Säulenchromatographie, bei der Druck angewandt wird. Sie dient zur Trennung von Substanzgemischen sowie deren qualitativer und quantitativer Analyse.

Dabei wird das Elutionsmittel mit Hilfe von Pumpen durch die mit der stationären Phase gefüllten Trennsäule gedrückt. Ein großer Teil der Stoffe kann mit Hilfe der Adsorptionschromatographie analysiert werden. Die Trennung kann an polaren, unbehandelten Normalphasen oder an unpolaren, chemisch modifizierten Umkehrphasen (Reversed Phase) durchgeführt werden. Bei der Trennung an Umkehrphasen wie im Falle der MDA-Messung finden sowohl Adsorptionsvorgänge als auch Verteilungsvorgänge statt.

6.15.2 Durchführung

Zur MDA-Messung wurden den in 50 µl aliquotierten Proben jeweils 750 µl Phosphorsäure und 250 µl Thiobarbitursäure (TBA) zugefügt und mit destilliertem Wasser auf 1500 µl aufgefüllt. Nach dem Mischen wurde der Ansatz eine Stunde bei 100 °C gekocht und anschließend bis zur HPLC-Analyse im Eiswasser gekühlt. Die Negativkontrolle, die Wasser und die Standards (TEP; Tetrahydropropan) enthielten, bekamen die gleiche Behandlung.

Nach Abkühlung wurden jeweils 500 µl des Probengemisches mit 500 µl methanolischer NaOH neutralisiert, 5 Minuten bei 14000 Umdrehungen/Minuten zentrifugiert und 50 µl des Überstandes auf die Säule injiziert. Die Messung fand bei einer Wellenlänge von 532 nm statt. Durch Integration der in ihrer Größe zur MDA-Konzentration korrelierenden Peaks konnte die Proben-MDA-Konzentration ermittelt werden.

6.16 Statistische Auswertung

Alle Daten sind als arithmetisches Mittel T mit Standardfehler (SEM) angegeben. Beim Vergleich zweier unabhängiger Versuchsgruppen wurde der Student-t-Test, beim Vergleich von mehreren Gruppen die doppelte Varianzanalyse (two-way ANOVA) angewandt.

Unterschiede zwischen Gruppen wurden als signifikant erachtet, wenn die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler erster Ordnung weniger als 5 % ($p \leq 0,05$) betrug. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Computerprogramme StatView (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, USA) und GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) durchgeführt.

7. Ergebnisse

7.1 **Protektiver Effekt eines eNOS-Modulators in vivo**

Bei der Untersuchung einer Forschungssubstanz der Pharmaindustrie Sanofi-Aventis, dem eNOS-Modulator AVE 9488, auf die eNOS-Expression und den Einfluss auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden wurden Mäuse eine Woche lang mit Pellets, die diese Substanz enthielten, bzw. Placebo gefüttert. Anschließend wurden diese Tiere einer Okklusion der Herzkranzarterie mit darauf folgender Reperfusion unterzogen und deren Infarktgröße durch in vivo-Färbemethoden ermittelt.

35 Mäuse, die Verum-Futter, und 37 Mäuse, die Placebo-Futter erhielten, wurden in die Studie eingeschlossen. Während bereits drei Tiere der Verum-Gruppe und fünf der Placebo-Gruppe bei der Operation verstarben, wurden die restlichen Herzen für Infarktgrößenbestimmung sowie für weitere molekularbiologische Untersuchungen gewonnen.

7.1.1 *Ischämie/Reperfusion-Ergebnisse*

Die Auswertung der Ischämie-/Reperfusionsexperimente ergab einen vergleichbaren Wert für das gefährdete Gebiet (Placebo vs. eNOS-Modulator $39,8 \pm 2,4$ vs. $37,6 \pm 2,3$ %), jedoch eine reduzierte Infarktgröße bei den mit AVE 9488 gefütterten Tieren (Placebo vs. eNOS-Modulator $65,4 \pm 4,1$ vs. $36,9 \pm 4,0$ %, $p = 0,0004$). Um zu überprüfen, dass der Effekt auf der gesteigerten eNOS-Expression beruht, wurden Mäuse, bei denen das für die eNOS-Expression verantwortliche Gen fehlte, mit dem gleichen Futter gefüttert und mit der gleichen Operationsmethode untersucht. Diese Mäuse wurden in der Arbeitsgruppe von Shesely entwickelt und charakterisiert und eignen sich durch die spezifische Deletion des eNOS-Gens (eNOS^{-/-}) für die Überprüfung der Wirkung der Testsubstanz. Bei diesen eNOS^{-/-} Mäusen wurde ein Konstrukt pENOSX in die Keimbahn eingeschleust. Dabei wurde bei einem 4.7- kb Xba I-Fragment ein 129 bp großer Abschnitt im Exon 12 durch eine 1.2-kb-Sequenz ersetzt. Diese Sequenz beinhaltet ein neomycinresistentes Gen (Neo) aus

pMC1Neo polA, das sich gegensätzlich zum eNOS-Gen orientiert [76]. Somit kam es zum Verlust der Calmodulin-Bindungsseite, die eine wichtige Rolle beim Entfalten der eNOS-Funktion ausübt und den Elektronentransfer auf die aktive Seite des Enzyms ermöglicht.

Erwartungsgemäß beeinflusste die Substanz AVE 9488 nicht die eNOS-Expression und damit den Ischämie-/Reperfusionsschaden bei den eNOS-Knock-Out-Tieren (eNOS KO). Bei ähnlicher area at risk (AAR) ergaben sich bei Werten für Infarkt/AAR bei eNOS KO mit Placebo-Futter sowie eNOS KO mit Verum-Futter keine Unterschiede (eNOS KO Placebo vs. eNOS KO eNOS-Modulator, $59,3 \pm 6,8$ vs. $64,1 \pm 6,3$ %, $p = \text{n.s.}$).

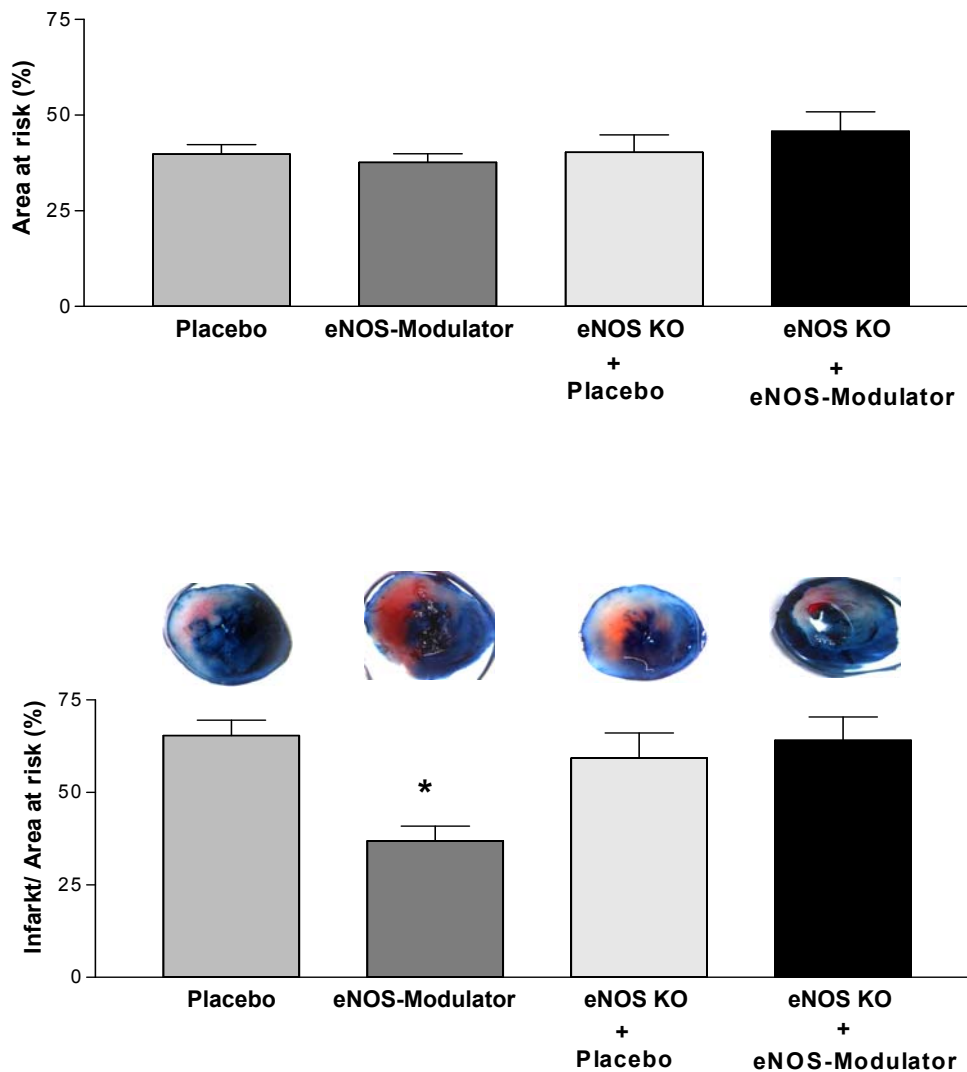


Abbildung 11:

Auswertung der Ischämie/Reperfusion nach Evans-Blue- und TTC-Färbung.

Graph 1 stellt den Anteil des gefährdeten Areals bei Wildtyp-Mäusen, die mit Placebo bzw. mit eNOS-Modulator gefüttert wurden, sowie bei mit Placebo bzw. eNOS-Modulator gefütterten eNOS-Knock-Out-Mäusen (eNOS KO) dar; Graph 2 zeigt den prozentualen Anteil des Infarkts am gefährdeten Gebiet (*: $p < 0,005$).

7.1.2 eNOS-Expression

24 Stunden nach den Ischämie-/Reperfusionsexperimenten wurden die Organe entnommen und mittels Real-Time-PCR die eNOS-Expression im Herzen gemessen. Dabei zeigten die mit AVE 9488 gefütterten Mäuse eine signifikante Steigerung der Expression im Gegensatz zu Placebo-Tieren (Placebo vs. eNOS-Modulator, $2,36 \pm 0,24$ vs. $4,59 \pm 0,91$; $p = 0,027$).

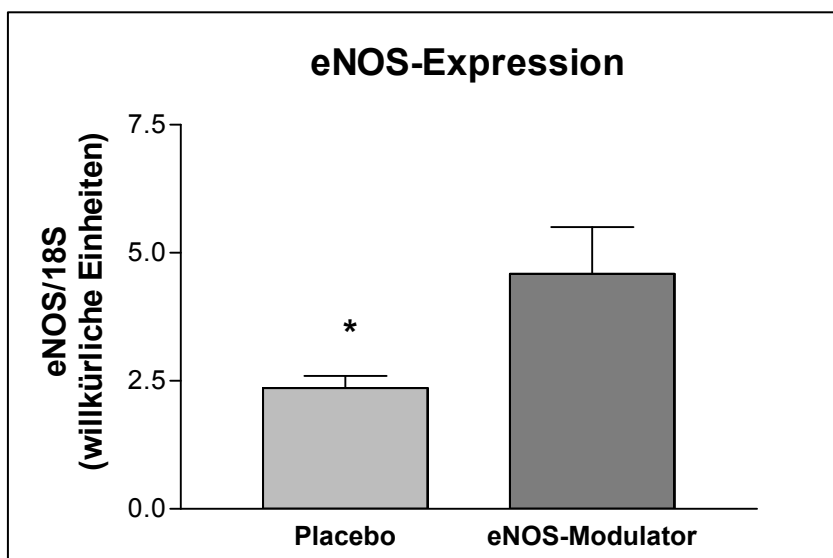


Abbildung 12:

Gesteigerte eNOS-Expression bei mit eNOS-Modulator gefütterten Mäusen (*: $p < 0,05$).

7.1.3 Aktivierung der Enzyme AKT und pAKT

Die eNOS kann durch die Proteinkinase B (AKT) am Serin in Position 1177 phosphoryliert und damit aktiviert werden. Dafür muss das Enzym AKT selbst durch Phosphorylierung mit Hilfe von Phosphatidylinositol-3-Kinase oder Calmodulin/Ca²⁺-abhängige Proteinkinase-Kinase in die aktive Form überführt werden. Um den Einfluss des eNOS-Modulators auf die AKT-Proteinexpression und ebenfalls auf die Quantität seiner aktiven phosphorylierten Form zu untersuchen, wurde mit spezifischen Antikörpern gegen AKT und pAKT in der Western-Blot-Methode der Gehalt an dem zu untersuchenden Protein bestimmt.

Nach der densitrometrischen Auswertung zeigte sich kein Unterschied in der AKT-Expression. Bei den mit eNOS-Modulator gefütterten Mäusen ergab sich ein Wert von 1520 ± 88 Einheiten bei 20 µg eingesetztem Protein, der Wert bei den Placebo-Tieren lag bei 1509 ± 156 Einheiten/20 µg Protein.

Die pAKT-Expression war bei den eNOS-Modulator-Tieren leicht erhöht, ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied zu Placebo-Mäusen (pAKT-Expression/20 µg Protein; Placebo vs. eNOS-Modulator, 542 ± 101 vs. 1116 ± 472).

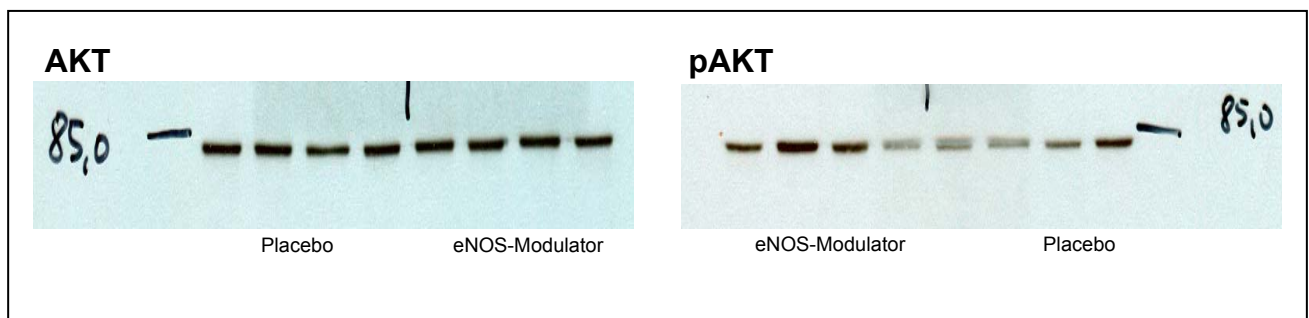


Abbildung 13:

Charakteristische Banden der Proteine aus der Herzspitze, die spezifisch für die Expression der Enzyme Proteinkinase B (AKT) und phosphorylierte Proteinkinase B (pAKT) sind. Während bei AKT kein Unterschied in der Bandenstärke bei den beiden Tiergruppen zu sehen ist, ist bei pAKT eine Tendenz zu erhöhter Expression bei mit AVE 9488 behandelten Tieren zu beobachten.

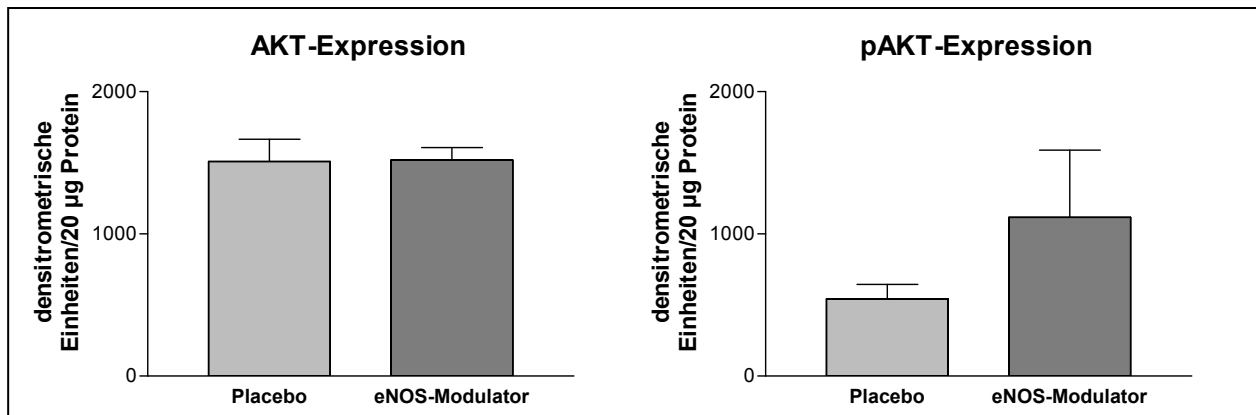


Abbildung 14:

Densitometrische Auswertung der Western-Blot-Banden.

7.1.4 Oxidativer Stress

Da in Folge der Ischämie/Reperfusion viele Radikale freigesetzt werden und damit den Reperfusionsschaden vorantreiben, wurde die Wirkung dieser Substanz auf den oxidativen Stress näher untersucht. Dafür wurde Malondialdehyd als Indikator für die Lipidperoxidation im Serum mittels HPLC gemessen. Diese Bestimmung ergab eine reduzierte Lipidperoxidation bei Tieren, die mit eNOS-Modulator gefüttert wurden (Placebo vs. eNOS-Modulator $3,2 \pm 0,5$ vs. $0,8 \pm 0,07$ $\mu\text{mol/l}$; $p = 0,0003$).

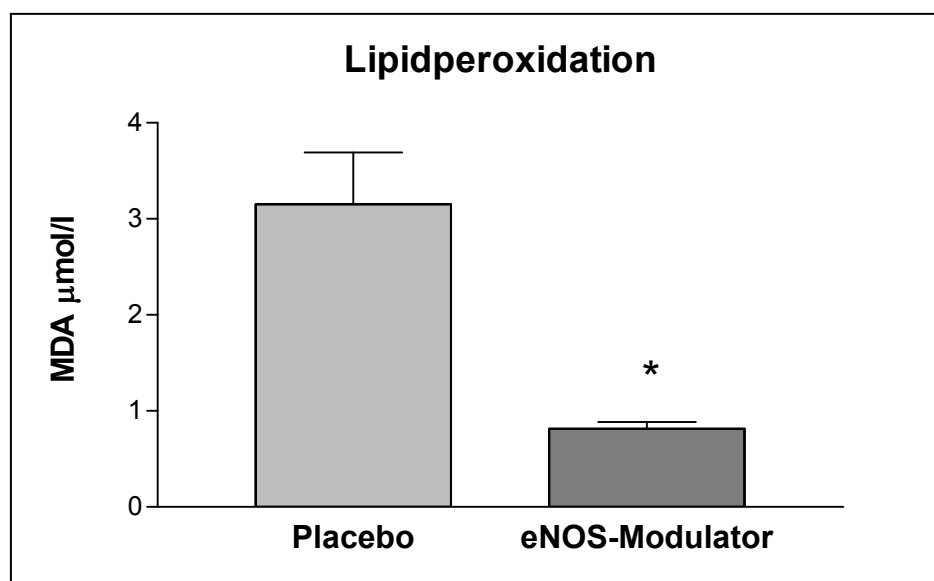


Abbildung 15:

Reduzierte Lipidoxidation bei mit eNOS-Modulator gefütterten Mäusen (*: $p < 0,05$).

7.1.5 Nitrotyrosin

Das Ausmaß der Entstehung des Nitrotyrosins gilt als weiterer Indikator für den oxidativen Stress.

Bei der Ischämie/Reperfusion kommt es zur Freisetzung freier Radikale und somit zur Bildung des Peroxynitrits aus Stickstoffmonoxid und Superoxid. Das starke Nitrierungsmittel reagiert anschließend mit dem Phenolring der Aminosäure Tyrosin unter Bildung des stabilen 3-Nitrotyrosins.

Bei der Bestimmung des Nitrotyrosins im Myokard mittels ELISA und ebenfalls in der Immunhistochemie mit einem spezifischen Nitrotyrosin-Antikörper zeigte sich jedoch kein positiver Effekt des eNOS-Modulators auf die Nitrierung der Aminosäure. Die Placebo-Mäuse wiesen sogar einen gering reduzierten Nitrotyrosingehalt auf (Nitrotyrosin nM/10 µg Protein, eNOS-Modulator vs. Placebo, $4,76 \pm 0,48$ vs. $3,30 \pm 0,75$).

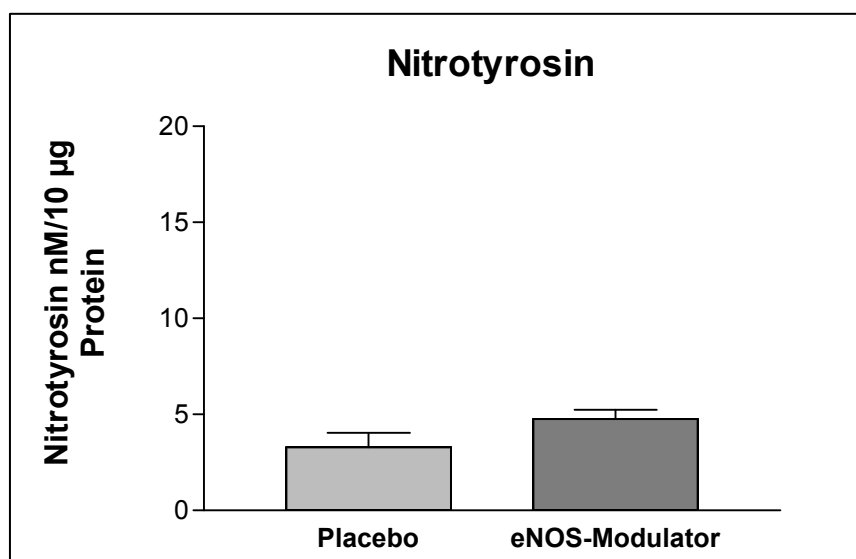


Abbildung 16:

Auswertung des Nitrotyrosin-ELISAs aus Herzproteinen; hier war kein Unterschied in der Nitrotyrosinproteinkonzentration zu beobachten.

7.1.6 Antioxidantien

Der reduzierte oxidative Stress wurde jedoch nicht durch das Enzym ecSOD reguliert, da die Expression auf der RNA Ebene bei den Gruppen auf dem gleichen Niveau lag (ecSOD/18S, Placebo vs. eNOS-Modulator $0,38 \pm 0,03$ vs. $0,41 \pm 0,04$, $p=n.s.$).

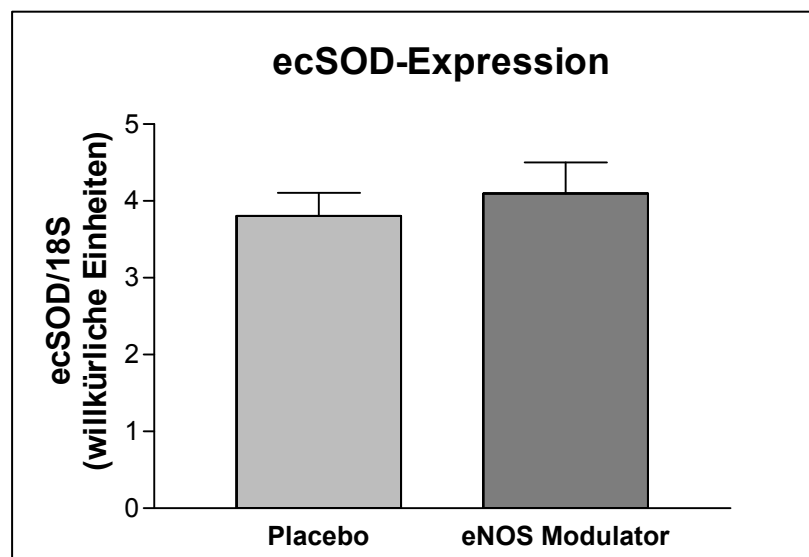


Abbildung 17:

Superoxiddismutase-Expression (ecSOD) ermittelt mit spezifischer TaqMan-Sonde ($p = n.s.$).

7.1.7 Einwanderung neutrophiler Granulozyten

Die Reperfusionphase ist durch eine verstärkte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten im ischämischen Gebiet gekennzeichnet. Dieses Areal wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen die Maus-Neutrophilen in der Immunhistochemie gefärbt. Die positiven Zellen wurden anschließend unter einem Mikroskop ausgezählt. Die Anzahl der infiltrierten Zellen betrug bei eNOS-Behandlung 86 ± 5 , bei Placebo-Mäusen 56 ± 4 .

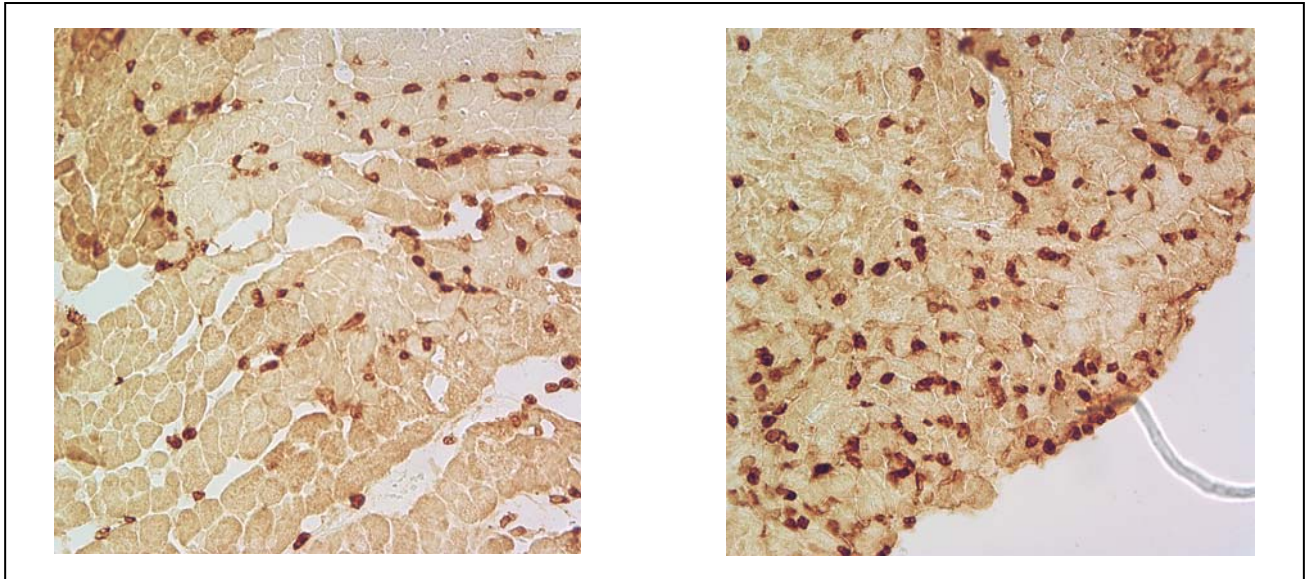


Abbildung 18:

Herzausschnitt behandelt mit spezifischem Antikörper gegen neutrophile Granulozyten.

Das erste Bild gehört einem mit Placebo, das zweite Bild einem mit eNOS-Modulator behandelten Tier.

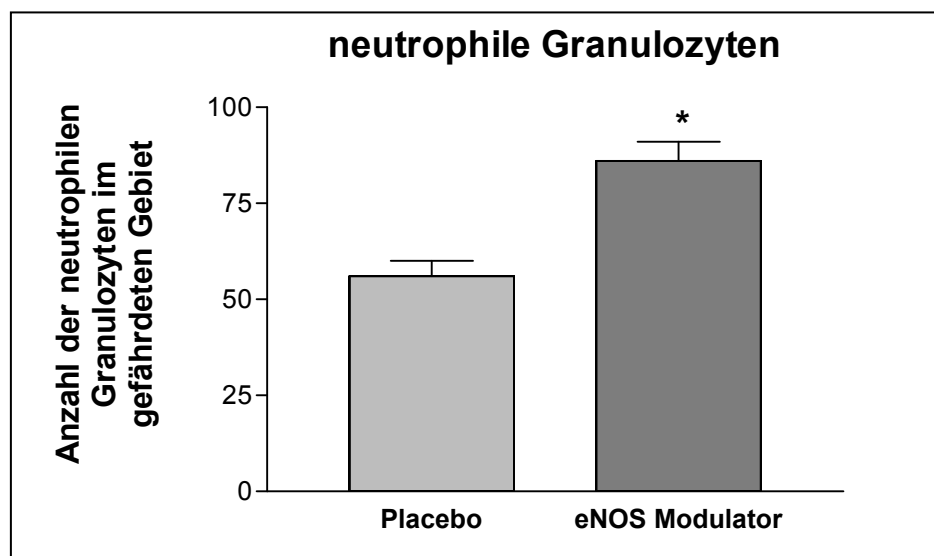


Abbildung 19:

Anzahl der neutrophilen Granulozyten im gefährdeten Gebiet (*: $p < 0,05$).

7.1.8 ICAM/LIX-Expression

In der frühen Phase der Reperfusion kommt es zur erhöhten Expression von ICAM-1 und LIX im ischämischen Areal. Dies führt wiederum zur erhöhten Adhärenz und Infiltration von neutrophilen Granulozyten in das wieder versorgte Myokard und damit zur Freisetzung zytotoxischer Substanzen. Die Wirkung des eNOS-Modulators auf die ICAM-1- und LIX-Expression im ischämischen Gebiet wurde auf der mRNA-Ebene mit Hilfe von spezifischen TaqMan-Sonden bestimmt. Dabei bewegte sich der Wert für die ICAM-1-Expression bei $3,97 \pm 0,32$ bei der eNOS-Modulator- und $3,72 \pm 0,48$ bei der Placebo-Behandlung. Die Werte für die LIX-Expression lagen ebenfalls auf der gleichen Ebene (Placebo vs. eNOS-Modulator, $1,0 \pm 0,16$ vs. $1,0 \pm 0,17$).

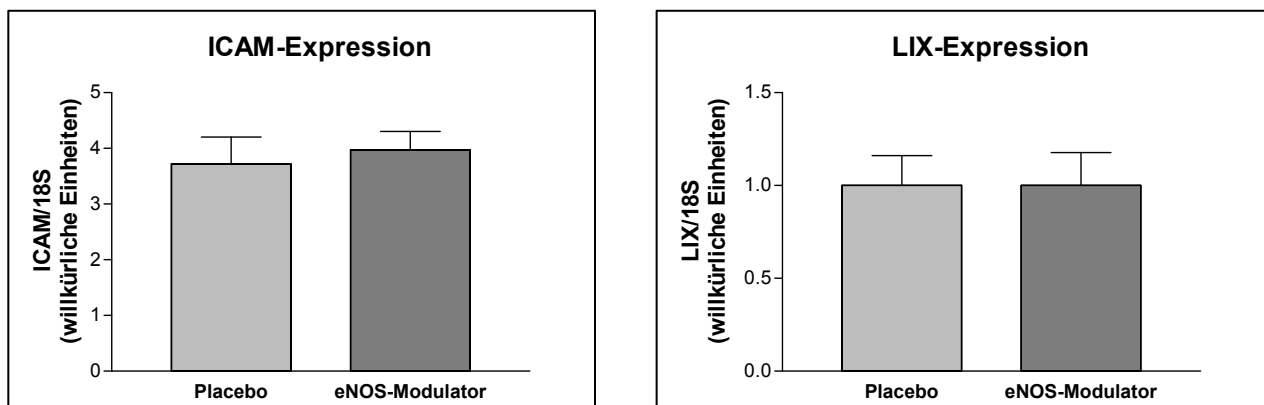


Abbildung 20:

Auswertung der Adhäsionsmolekül- (ICAM) und Chemokin-Expression (LIX) mittels Real-Time-PCR mit spezifischen TaqMan-Sonden.

7.1.9 Proinflammatorische Proteine

Da die Inflammation beim Ausmaß des Ischämie-/Reperfusionsschadens eine bedeutende Rolle spielt, wurde die Freisetzung des Tumor-Nekrose-Faktors- α quantitativ mittels Real-Time-PCR bestimmt. Die mit eNOS-Modulator gefütterten Tiere wiesen eine reduzierte, jedoch nicht signifikante TNF- α -Expression im gefährdeten Areal auf (Placebo vs. eNOS-Modulator, $5,0 \pm 2,0$ vs. $2,0 \pm 1,0$).

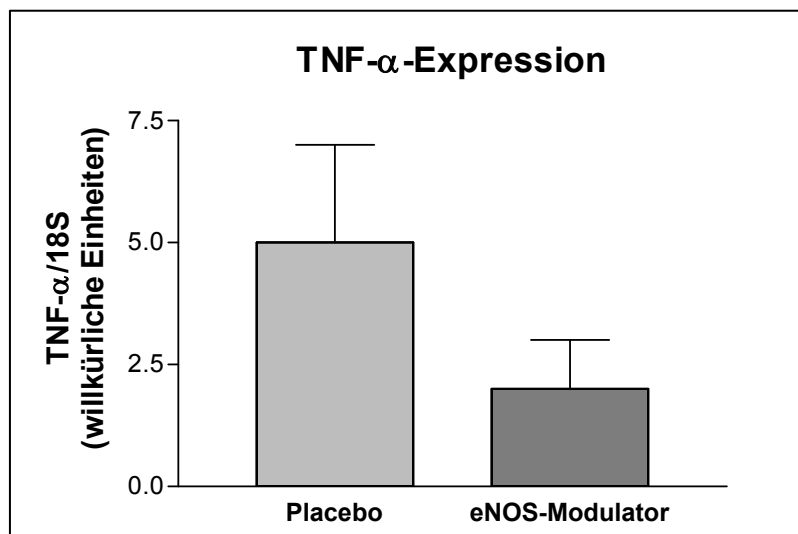


Abbildung 21:

Auswertung der Tumor-Nekrose-Faktor- α -Expression (TNF- α -Expression) mittels Real-Time-PCR mit spezifischer TaqMan-Sonde.

7.2 Rolle von NF- κ B in der Ischämie/Reperfusion

Um die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B in der Pathogenese der Ischämie/Reperfusion am Herzmuskel näher zu untersuchen, wurden bei diesem Modell Mäuse verwendet, bei denen die Untereinheit p50 inaktiviert wurde.

Die Untereinheit p50 sowie p65 gehören zu der großen NF- κ B/Rel Familie der Transkriptionsfaktoren. Es wurden bereits fünf Mitglieder identifiziert: NFKB1 (p50 und die Vorstufe p105), NFKB2 (p52 und die Vorstufe p100), p65 (RelA), c-Rel (Rel) und RelB. Die meisten dieser Mitglieder sind fähig, in vitro Heteromere zu bilden. Als Dimere können alle fünf mit der κ B-DNA-Sequenz Komplexe eingehen und somit die Transkription von κ B-Reportergenen positiv oder negativ beeinflussen. Alle Einheiten zeichnen sich durch eine aus 300 Aminosäuren bestehende homologe Domäne aus, die einerseits für die Dimerisierung und andererseits für die Bindung an die κ B-DNA-Sequenz verantwortlich ist.

Um die Untereinheit p50 auszuschalten wurde bei den hier vorliegenden Mäusen ihre Vorstufe p105 verwendet [53]. Die Vorstufe p105 beinhaltet p50 in der N-terminalen Hälfte und I κ B- γ in seinem C-Endstück. Dafür wurde das pp50KO-Konstrukt entworfen, um das NFKB1-Gen zu unterbrechen. Das geschah durch den Einbau einer Neomycin-Resistenz-Kassette in das Exon 6 des NFKB1-Gens. Das Exon 6 kodiert für die Aminosäuren 134 bis 187. Diese Aminosäuren liegen innerhalb der homologen Domäne, welche von Aminosäure 30 bis 330 erstreckt. Diese Unterbrechung führt dazu, dass das entstandene Polypeptid weder Homo- bzw. Dimere ausbilden noch Komplexe mit der κ B-DNA-Sequenz eingehen kann. Dieses Konstrukt blockiert zusätzlich die weitere Entstehung der Untereinheit p50 aus ihrer Vorstufe p105 [53].

Diese auf gentechnischem Wege veränderten p50 KO-Mäuse sowie die entsprechenden Kontrollmäuse (C57/Bl6N) im Alter von 8 bis 12 Wochen und einem Körpergewicht von 20 bis 28 g wurden einer Ligatur einer Herzkranzarterie unterzogen. Die anschließend gewonnenen Herzen von elf Kontrolltieren und neun p50 KO-Mäusen konnten zur Infarktgrößenbestimmung und zur Ermittlung der inflammatorischen Prozesse herangezogen werden.

7.2.1 Ischämie/Reperfusion-Ergebnisse

Nach 30-minütiger Okklusion der linken absteigenden Herzkranzarterie und anschließender 24-stündiger Reperfusionsphase wurde das Ausmaß des Myokardschadens ermittelt.

Dabei zeigte sich ein vergleichbarer Wert für das gefährdete Areal bei beiden Versuchsgruppen. Bei den p50 KO-Mäusen bewegte sich der Anteil der AAR am linken Ventrikel um 45,3 % ($\pm 2,6$ %), bei den Wildtyp-Mäusen um 38,2 % ($\pm 2,5$ %).

Bei der Ermittlung der Größe des Ischämie-/Reperfusionsschadens bezogen auf das ligierte Gebiet war jedoch ein signifikanter Unterschied zu sehen. Bei den p50 KO-Mäusen betrug der Infarktanteil nur 21,4 % $\pm 4,8$ %, bei den Wildtyp-Mäusen jedoch 48,7 % $\pm 7,1$ % ($p = 0,004$). Somit führt die gezielte Ausschaltung der NF- κ B Untereinheit p50 zu einem signifikant reduzierten Ischämie-/Reperfusionsschaden.

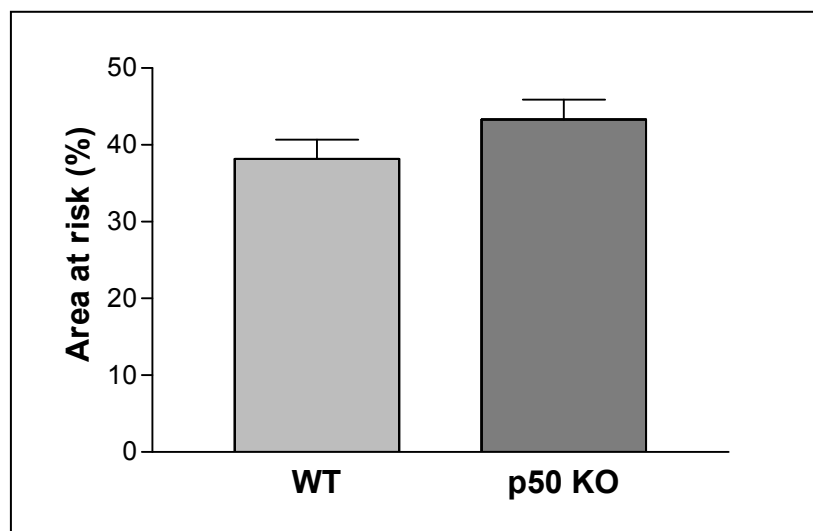


Abbildung 22:

Auswertung der Ischämie/Reperfusion nach Evans-Blue- und TTC-Färbung.

Der Graph stellt den Anteil des gefährdeten Areals am gesamten Herzen bei Wildtyp- (WT) und p50 Knock-Out-Mäusen (p50 KO) dar.

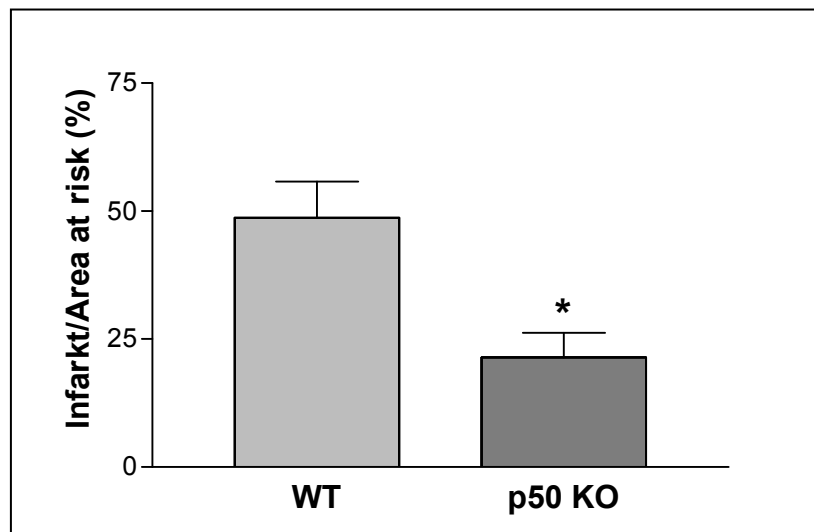


Abbildung 23:

Auswertung der Ischämie/Reperfusion nach Evans-Blue- und TTC-Färbung.

Der Graph zeigt den prozentualen Anteil des Infarkts am gefährdeten Gebiet bei Wildtyp- (WT) und p50 Knock-Out-Mäusen (p50 KO) (: $p < 0,05$).*

7.2.2 NF- κ B Aktivierung

Durch die Unterbrechung des Exons 6 des NFKB1 durch eine Neomycin-Resistenz-Kassette kann der Transkriptionsfaktor NF- κ B nicht mehr aktiviert werden. Dieses Phänomen wurde mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) überprüft. Dafür wurden erstmal Milzlymphozyten, die jeweils aus den p50 KO-Mäusen und den Kontrolltieren gewonnen wurden, mit LPS stimuliert. Aus diesen Zellen wurde anschließend das nukleäre Protein extrahiert und die DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B getestet. Wie die Abbildung 24 deutlich zeigt, kommt es durch die Ausschaltung der p50-Untereinheit zu keiner NF- κ B-Aktivierung, während bei den Kontrolltieren die starke Bande im oberen Teil des Gels auf eine volle Funktionsfähigkeit des Transkriptionsfaktors hindeutet.

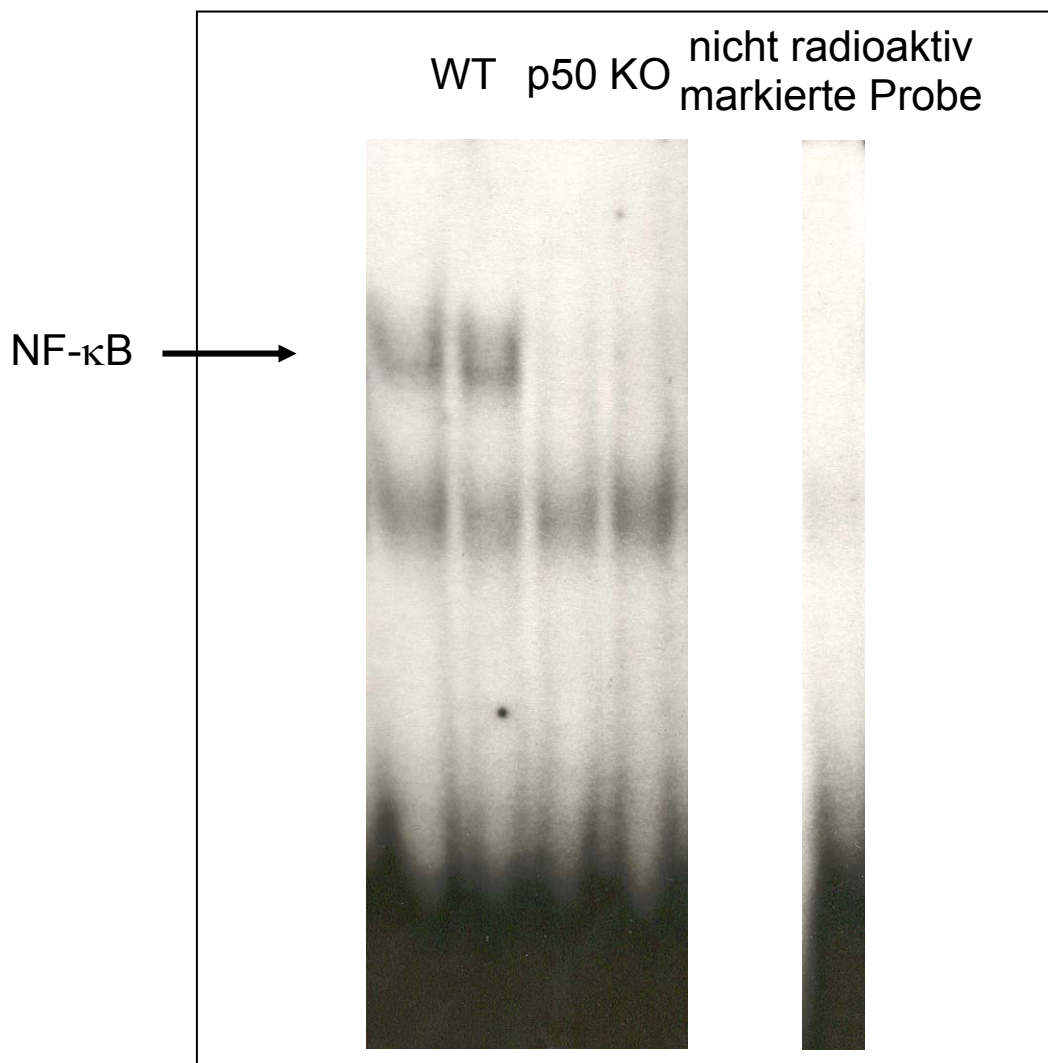


Abbildung 24:

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) zum Nachweis der NF-κB-Aktivierung im nucleären Extrakt. Bei p50 Knock-Out-Mäusen (p50 KO) wurde der Transkriptionsfaktor nicht aktiviert, dies ist an der fehlenden Bande in der oberen Hälfte sichtbar (modifiziert nach Frantz [77]).

7.2.3 Proinflammatorische Proteine

Mit dem Hintergrund, dass NF-κB die Transkription der proinflammatorischen Zytokine beeinflusst und diese wiederum verstärkt an der ischämischen Schädigung beteiligt sind, wurde nach 30 Minuten Ischämie und 24 Stunden Reperfusion das Ausmaß der Expression des Entzündungsmarkers TNF- α im reperfundierten Gewebe bestimmt und an der Expression von 18S normiert. Überraschenderweise ergab das Verhältnis von

TNF- α - zu 18S-Expression einen signifikant höheren Wert bei den p50 KO-Mäusen, obwohl bei diesen der Transkriptionsfaktor NF- κ B nicht aktiviert werden kann.

Die TNF- α -Expression betrug bei den genveränderten Mäusen $1,0 (\pm 0,1)$, bei den Wildtyp-Mäusen $0,3 (\pm 0,1)$ ($p = 0,001$).

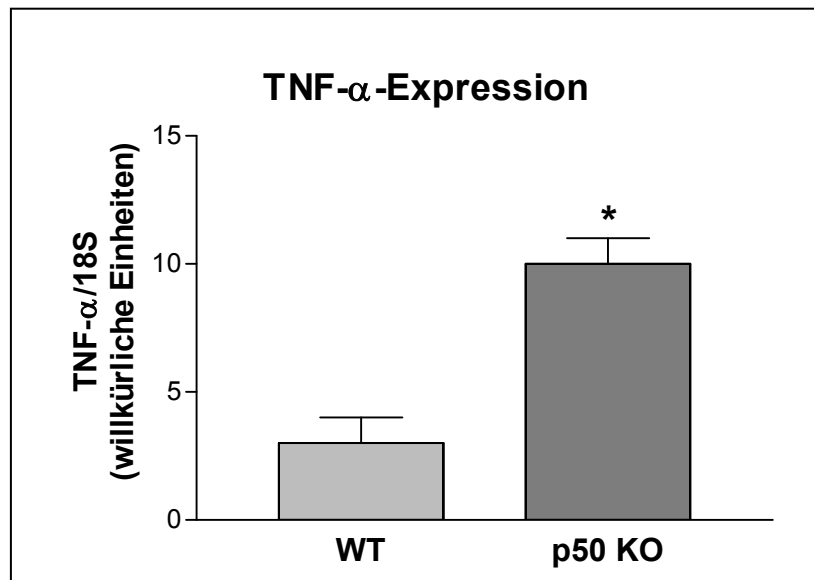


Abbildung 25:

Auswertung der Tumor-Nekrose-Faktor- α -Expression (TNF- α) mittels Real-Time-PCR mit spezifischer TaqMan-Sonde bei Wildtyp- (WT) und p50 Knock-Out-Mäusen (p50 KO) (*: $p < 0,05$).

Im nächsten Schritt wurde mittels Real-Time-PCR die Expression von ICAM-1 und LIX bestimmt. Beide Faktoren sind dafür bekannt, dass sie in der frühen Phase der Ischämie/Reperfusion aktiviert werden und dadurch verstärkt an der Infiltration der neutrophilen Granulozyten in das geschädigte Gewebe beteiligt sind. Besonders die Expression des Proteins ICAM-1 wird von dem Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert. Es zeigte sich hier, dass die Hemmung der NF- κ B-Aktivierung zu einem signifikanten Anstieg der ICAM-1- und LIX-Expression führt (ICAM-1/18S, WT vs. p50 KO, $0,7 \pm 0,24$ vs. $1,2 \pm 0,13$, $p < 0,05$); (LIX/18S, WT vs. p50 KO, $1,02 \pm 0,22$ vs. $2,39 \pm 0,46$, $p < 0,05$).

Die anschließend gemessene RNA-Expression des Adhäsionsproteins P-Selektin wurde jedoch nicht vom Genotyp beeinflusst. P-Selektin normiert auf 18S ergab für p50 KO Mäuse einen Wert von $0,53 (\pm 0,18)$ und für die Kontrolltiere einen Wert von $0,29 (\pm 0,1)$.

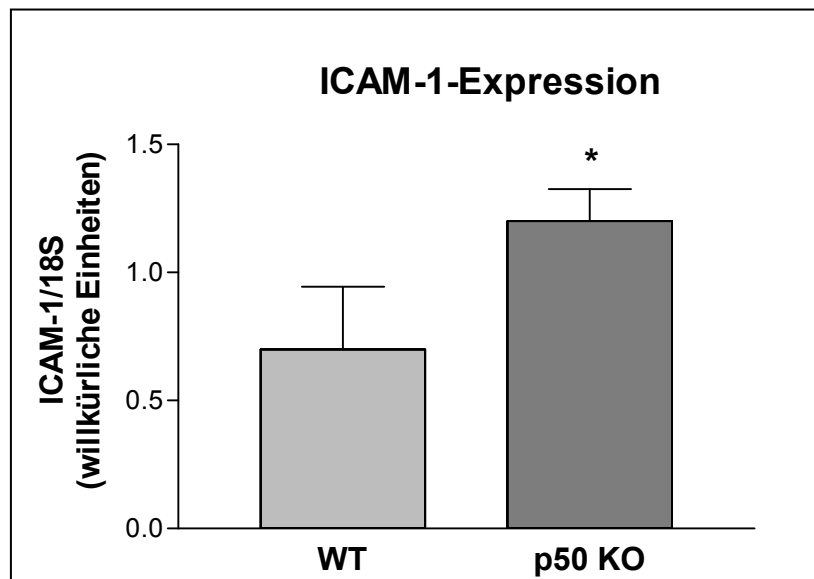


Abbildung 26:

Auswertung der Adhäsionsmolekül-Expression (ICAM-1) mittels Real-Time-PCR mit spezifischer TaqMan-Sonde bei Wildtyp- (WT) und p50 Knock-Out-Mäusen (p50 KO) (*: $p < 0,05$) (modifiziert nach Frantz [77]).

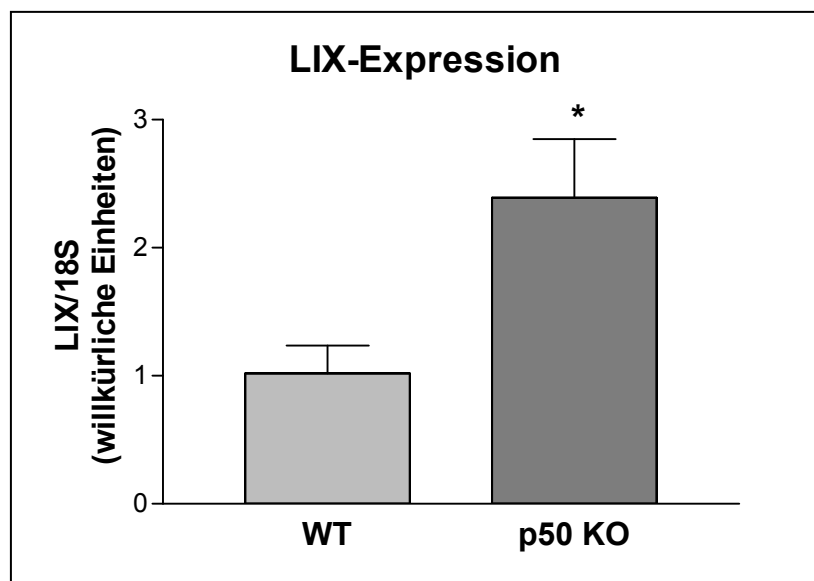


Abbildung 27:

Auswertung der Chemokin-Expression (LIX) mittels Real-Time-PCR mit spezifischer TaqMan-Sonde bei Wildtyp- (WT) und p50 Knock-Out-Mäusen (p50 KO) (*: $p < 0,05$) (modifiziert nach Frantz [77]).

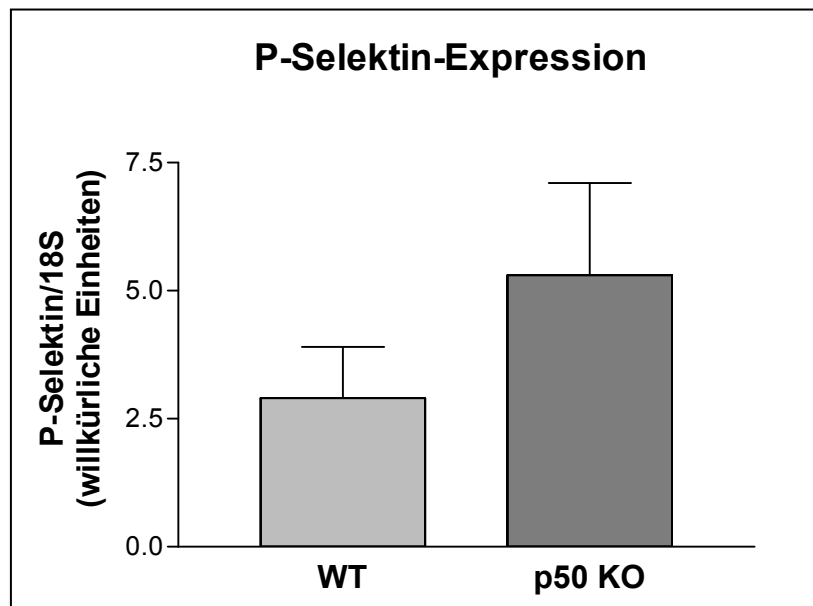


Abbildung 28:

Auswertung der P-Selektin-Expression mittels Real-Time-PCR mit spezifischer TaqMan-Sonde bei Wildtyp- (WT) und p50 Knock-Out-Mäusen (p50 KO).

7.2.4 Einwanderung neutrophiler Granulozyten

Nach 30 Minuten Ischämie und 24 Stunden Reperfusion wurde eine Einwanderung neutrophiler Granulozyten in das reperfundierte Myokardgewebe beobachtet. Diese Zellen wurden mit einer spezifischen Methode, der Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase-Reaktion, angefärbt und ausgezählt. Im Gegensatz zu den ermittelten molekularen Ergebnissen ergab sich hier eine signifikant reduzierte Infiltration der neutrophilen Granulozyten bei den p50 KO-Mäusen. Bei den unveränderten Tieren wurden $6,6 (\pm 1,4)$ eingewanderte Neutrophile pro mm^2 gezählt, bei den Wildtyp-Mäusen $24,7 (\pm 10,1)$ Zellen pro mm^2 ($p = 0,05$). Diese Beobachtung zeigt somit ganz deutlich, dass die Ausschaltung der Untereinheit p50 des Transkriptionsfaktors NF- κ B einen erheblichen Einfluss auf die Anhäufung der neutrophilen Granulozyten im geschädigten Areal hat.

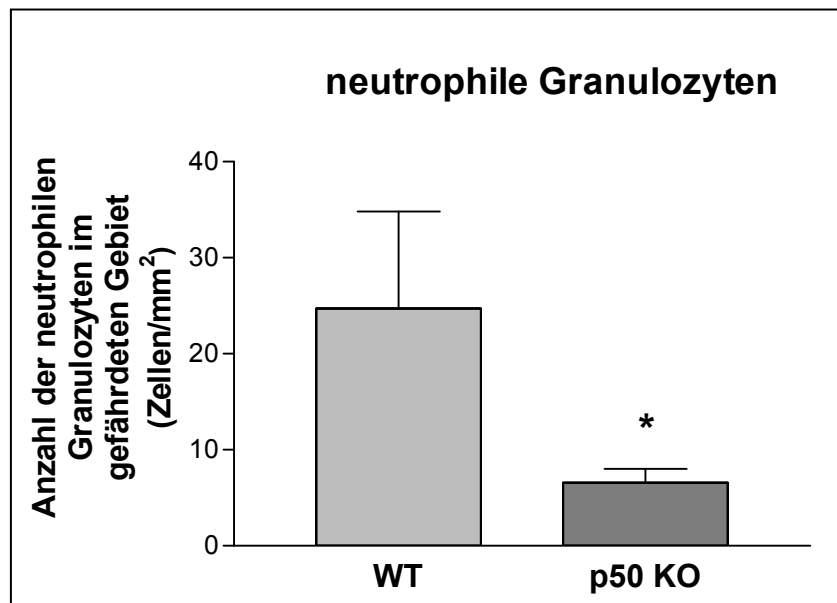


Abbildung 29:

Anzahl der neutrophilen Granulozyten im gefährdeten Gebiet bei Wildtyp- (WT) und p50 Knock-Out-Mäusen (p50 KO) (*: $p < 0,05$).

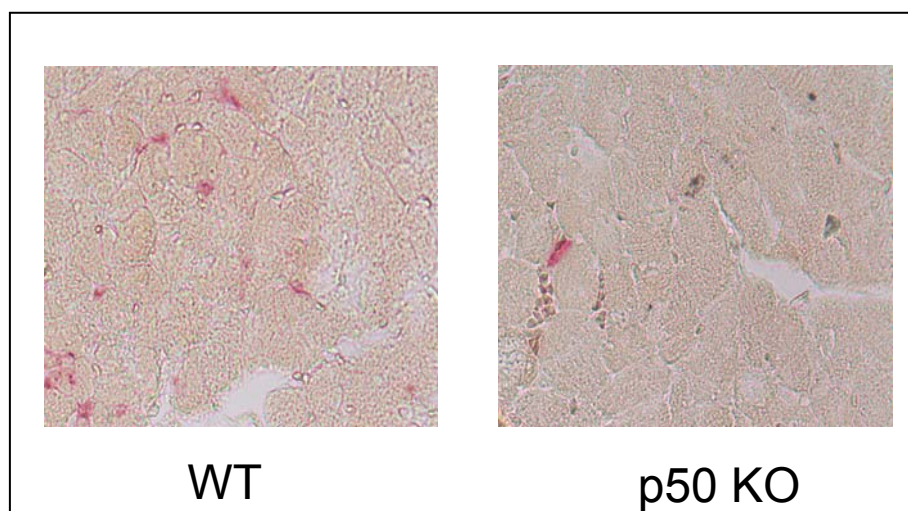


Abbildung 30:

Herzausschnitt behandelt mit spezifischer Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase-Färbung gegen neutrophile Granulozyten bei Wildtyp- (WT) und p50 Knock-Out-Mäusen (p50 KO) (modifiziert nach Frantz [77]).

7.2.5 Funktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Leukozyten

Die vorangegangenen Versuche demonstrierten eine starke Reduktion der Einwanderung der neutrophilen Granulozyten bei den p50 KO-Mäusen trotz erhöhter Expression der Proteine ICAM-1 und LIX. Diese Beobachtung ließ die Hypothese zu, dass die eingeschränkte Funktion von NF- κ B in den p50 KO-Leukozyten auf die geringere Ischämieschädigung bei den p50 KO-Mäusen zurückzuführen ist. Um diese Erklärung zu belegen wurden in vitro- sowie in vivo-Modelle entwickelt.

Tatsächlich zeigten in vitro-Versuche mit Knochenmarkzellen, welche aus den p50 KO-Mäusen gewonnen wurden, eine signifikant geringere Adhärenz auf Platten, die vorher mit Fibronectin überzogen wurden. Bei den Kontrolltieren dagegen konnten nach einer dreistündigen Behandlungsphase eine höhere Anzahl an adhärennten Zellen gezählt werden (Anzahl der adhärennten Zellen pro mikroskopisches Feld, WT vs. p50 KO, 450 ± 42 vs. 146 ± 17 , $p = 0,001$).

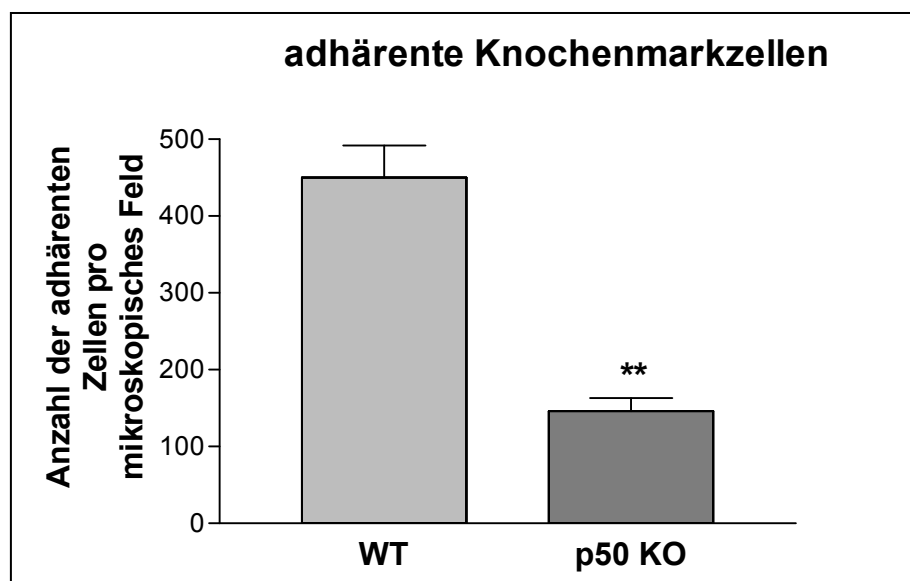


Abbildung 31:

Anzahl der adhärennten Zellen auf Fibronectin behandelten Platten bei Wildtyp- (WT) und p50 Knock-Out-Mäusen (p50 KO) (**: $p < 0,001$) (modifiziert nach Frantz [77]).

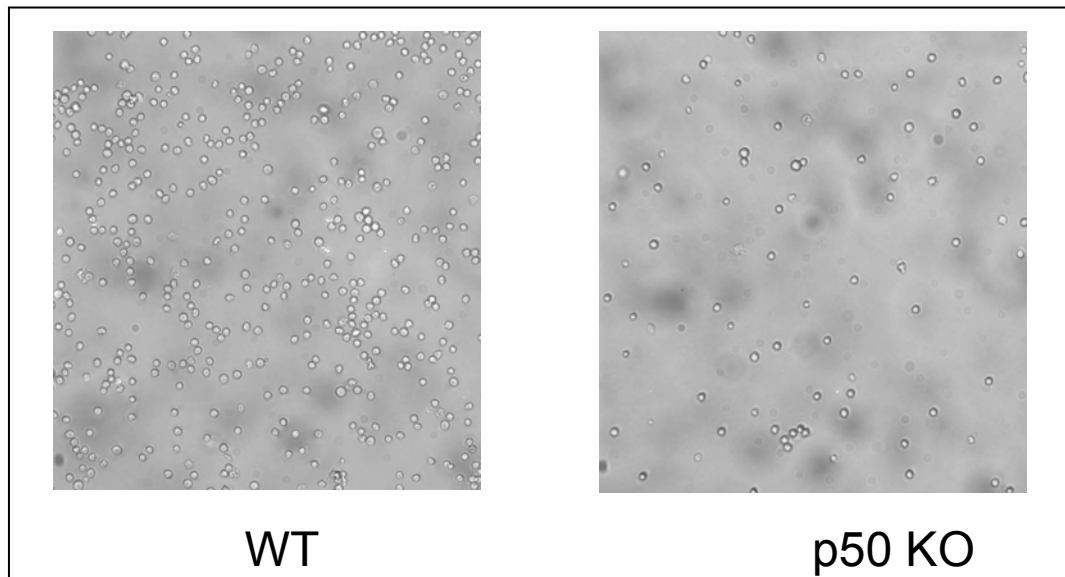


Abbildung 32:

Mikroskopischer Ausschnitt des Adhärenzversuchs mit Knochenmarkzellen auf Fibronektin behandelten Platten (modifiziert nach Frantz [77]).

Bei dem anschließenden in vivo-Modell wurde untersucht, ob der Schutzeffekt in der Myokardschädigung bei den genveränderten Mäusen nach einer Transplantation mit Wildtyp-Knochenmark immer noch gegeben war. Dafür war es wichtig, dass die Tiere zunächst 10 Tage vor dem Eingriff mit angesäuertem Wasser (pH 2), das zusätzlich die Antibiotika Polymyxin B und Neomycin enthielt, behandelt wurden, um das Infektionsrisiko gering zu halten. Am Tag der Transplantation erfolgte zunächst die vollständige Zerstörung der Blutzellen bei den p50 KO-Mäusen. Dies geschah unter Bestrahlung mit einer Caesium γ -Quelle (10 Gy). In der Zwischenzeit wurden die für die Transplantation benötigten Knochenmarkzellen der Kontrolltiere aus Femur und Tibia herauspräpariert und 5×10^6 solcher Zellen nach einer vierstündigen Ruhepause den bestrahlten Mäusen in die Schwanzvene injiziert. Nach sechs Wochen wurden diese Mäuse einer 30-minütigen Ischämie und 24-stündiger Reperfusion unterzogen und der Effekt des Wildtyp-Knochenmarks ermittelt. Hier war der Schutzeffekt, der auf die Inaktivierung der p50-Untereinheit zurückzuführen ist, wieder aufgehoben. Die ischämische Myokardschädigung lag wieder auf der Höhe der Werte bei den Kontrolltieren und ergab für Infarkt/AAR einen Wert von $50,9 \pm 9,5$ %. Ein direkter Einfluss durch die Knochenmarkstransplantation konnte mittels der Versuche mit p50 KO-Knochenmark, das in die bestrahlten p50 KO-Mäuse transplantiert wurde,

ausgeschlossen werden (Infarkt/AAR, p50 KO vs. p50 KO mit p50 KO-Knochenmark, $21,4 \pm 4,8 \%$ vs. $29,0 \pm 3,7 \%$).

Somit bestätigen die vorliegenden Ergebnisse die Hypothese, dass der Schutzeffekt in der Ischämie/Reperfusion auf die eingeschränkte Funktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Leukozyten zurückzuführen ist.

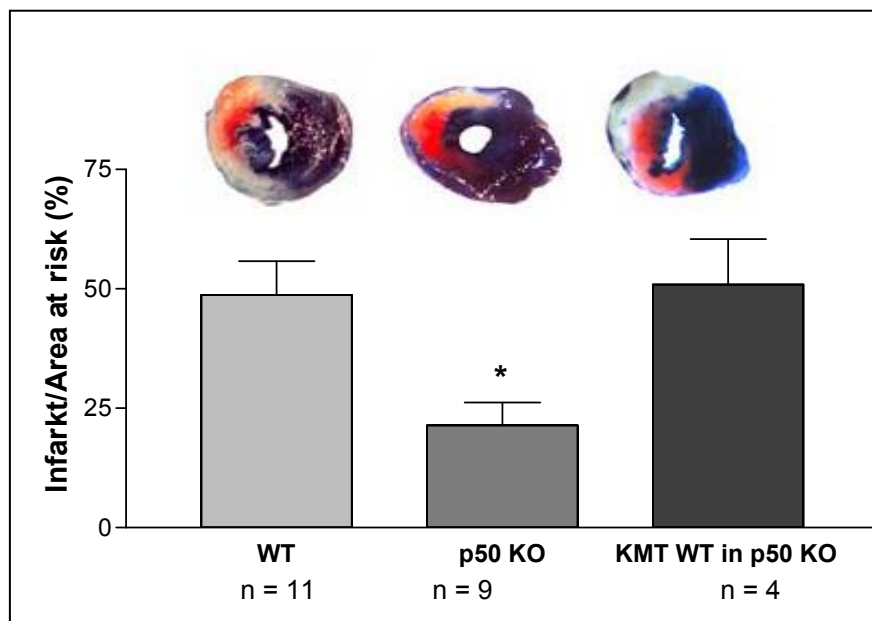


Abbildung 33:

Auswertung der Ischämie/Reperfusion nach Evans-Blue- und TTC-Färbung.

Der Graph zeigt den prozentualen Anteil des Infarkts am gefährdeten Gebiet bei Wildtyp- (WT), p50 Knock-Out-Mäusen (p50 KO) und p50 KO-Mäusen mit Wildtyp-Knochenmark (*: $p < 0,05$) (modifiziert nach Frantz [77]).

7.3 Einfluss von Aspirin auf den Myokardinfarkt

Um den Einfluss von hochdosiertem Aspirin auf die Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen nach Myokardinfarkt zu untersuchen, wurden 105 Mäuse einer Koronarligatur unterzogen. Nachdem 27 Tiere bereits während der Operation gestorben waren, wurden die restlichen 78 in zwei Gruppen aufgeteilt: 40 osmotische Pumpen gefüllt mit Aspirinlösung (120 mg/kg KG) sowie 38 Pumpen gefüllt mit einem Phosphatpuffer wurden subcutan zwischen den beiden Schultern implantiert. Die Tiere wurden vier Wochen lang beobachtet und am ersten, siebten sowie am 28. Tag einer Echokardiographie unterzogen. Während dieser Zeit gab es keine Unterschiede in der Sterberate: 26 (69,2 %) Mäuse in der Aspirin-Gruppe und 27 (69,2 %) in der Placebo-Gruppe überlebten den Beobachtungszeitraum. Als Folge von fortgeschrittener Herzinsuffizienz und Arrhythmien trat der Tod bei den restlichen Tieren auf.

Nach 28 Tagen erfolgte bei den überlebenden Tieren eine Organentnahme mit anschließender Ermittlung der Infarktgröße. Alle Tiere mit einem Infarkt größer als 30 % wurden für weitere Analysen eingeschlossen, sowie diejenigen, die keine echokardiographischen und histologischen Anzeichen für einen Infarkt hatten. Diese wurden in die scheinoperierte Gruppe (Sham) eingeteilt. Die Salicylsäurekonzentration, die nach dieser Periode im Plasma gemessen wurde, lag bei $0,23 \pm 0,0016$ nM bei den mit Aspirin behandelten Tieren, während die Placebo-Tiere keine nachweisbaren Mengen aufwiesen.

Körpergewicht und Herzgewicht waren in beiden Gruppen vergleichbar, d. h. die Salicylsäure hatte keinen Einfluss auf diese Parameter ausgeübt (siehe Tabelle 2).

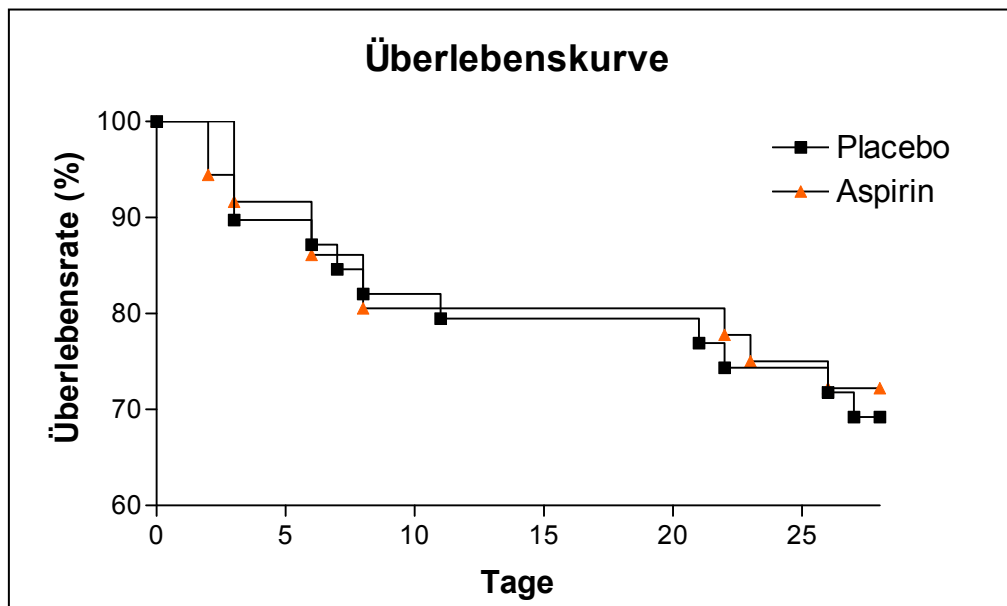


Abbildung 34:

Anteil der überlebenden Tiere in der Placebo- und Aspirin-Gruppe innerhalb von vier Wochen nach dem Myokardinfarkt.

7.3.1 Hämodynamische Untersuchung

Vier Wochen nach dem Myokardinfarkt wurden hämodynamische Messungen vorgenommen. Wie erwartet wiesen die scheinoperierten Tiere im Vergleich zu den Tieren, bei denen die linke Herzkranzarterie abgebunden wurde, höhere LVSP, LVEDP, dP/dt_{\max} und niedrigere Werte für dP/dt_{\min} auf. Man konnte jedoch keine Wirkung der vierwöchigen Behandlung mit hochdosiertem Aspirin auf die hämodynamischen Parameter feststellen (Tabelle 2).

	Sham Placebo	Sham Aspirin	MI Placebo	MI Aspirin
n	7	8	10	6
Infarktgröße [%]			50,09 ± 4,86	49,57 ± 4,98
Körpergewicht, nach 4 Wochen [g]	25,25 ± 0,53	25,98 ± 1,63	25,72 ± 0,40	25,67 ± 0,37
Herzgewicht, nach 4 Wochen [mg]	114,21 ± 5,03	128,66 ± 4,12	146,04 ± 7,63*	139,50 ± 5,20
Gewicht des linken Ventrikels [mg]	89,67 ± 3,96	102,40 ± 3,70	112,63 ± 3,90*	106,60 ± 3,18
LVSP [mmHg]	104,49 ± 4,70	103,58 ± 3,56	98,54 ± 3,16	91,15 ± 2,85*
LVEDP [mmHg]	3,21 ± 1,18	4,77 ± 1,08	8,30 ± 1,23*	6,69 ± 1,40
dP/dt _{max} [mmHg/s]	9061 ± 544	10883 ± 548	7837 ± 320*	7825 ± 342*
dP/dt _{min} [mmHg/s]	-7905 ± 285	-7579 ± 333	-6293 ± 282*	-6509 ± 349*

Tabelle 2:

*Organgewichte und hämodynamische Messungen bei scheinoperierten (Sham) und infarzierten (MI) Mäusen, die mit Placebo bzw. Aspirin behandelt wurden; die Daten werden als Mittelwerte ± SEM angegeben, *: $p < 0,05$ scheinoperierte vs. infarzierte Tiere.*

n Anzahl der Tiere; LVSP linksventrikulärer systolischer Druck; LVEDP linksventrikulärer enddiastolischer Druck; dP/dt_{max} maximale Druckänderung über die Zeit; dP/dt_{min} minimale Druckänderung über die Zeit (modifiziert nach Adamek [78])

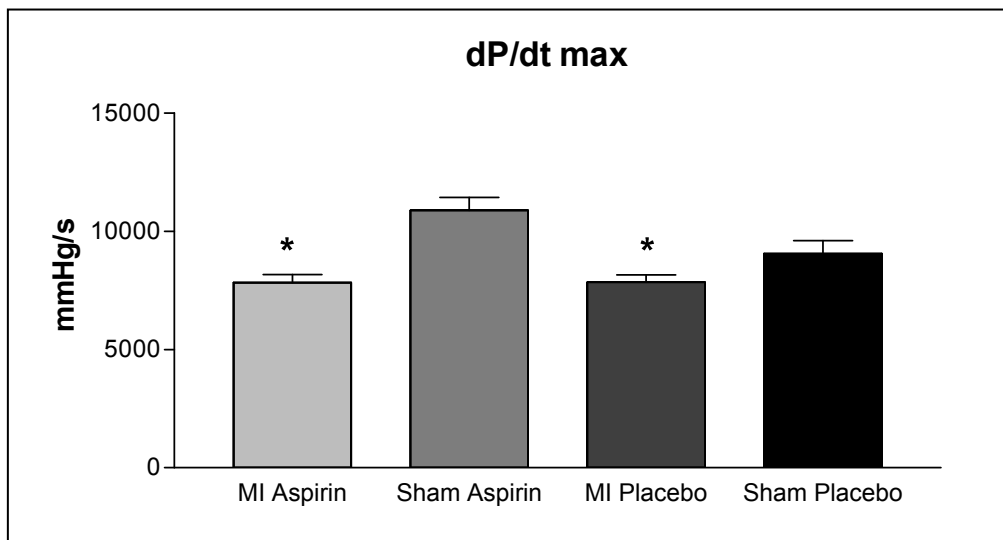


Abbildung 35:

Hämodynamische Messungen bei scheinoperierten (Sham) und infarzierten (MI) Mäusen, die mit Placebo bzw. Aspirin behandelt wurden, vier Wochen nach dem Myokardinfarkt.

Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, *: $p < 0,05$ scheinoperierte vs. infarzierte Tiere. (modifiziert nach Adamek [78]).

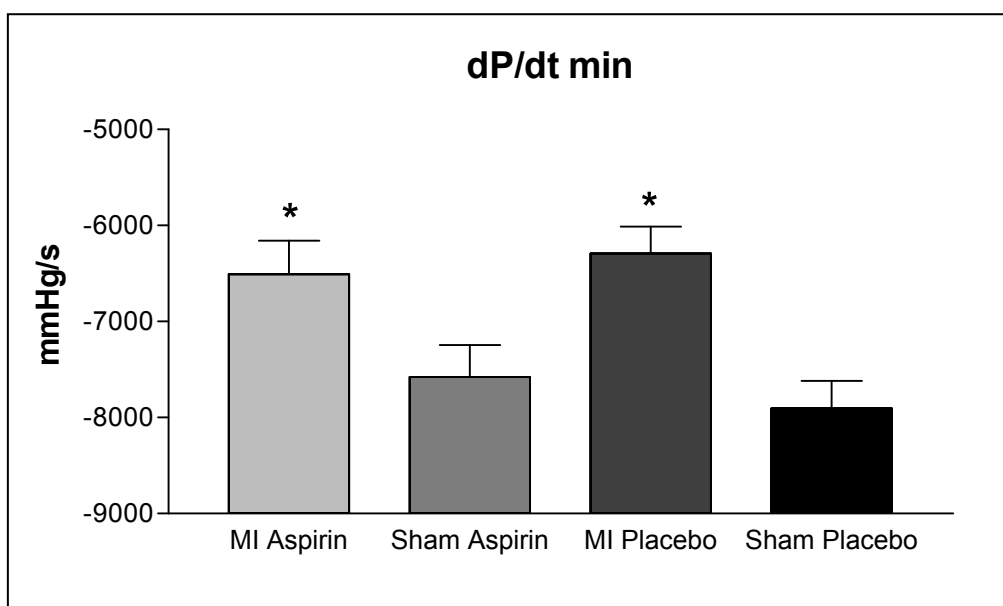


Abbildung 36:

Hämodynamische Messungen bei scheinoperierten (Sham) und infarzierten (MI) Mäusen, die mit Placebo bzw. Aspirin behandelt wurden, vier Wochen nach dem Myokardinfarkt.

Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, *: $p < 0,05$ scheinoperierte vs. infarzierte Tiere. (modifiziert nach Adamek [78]).

7.3.2 Echokardiographische Untersuchung

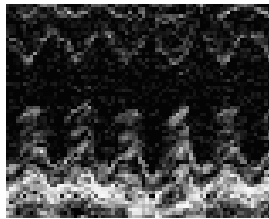
Zur Prüfung der Herzfunktion wurde am Tag 1, 7 und 28 nach dem Setzen der Koronarligatur die Echokardiographie durchgeführt. Die Messungen fanden in der apikalen sowie auf der papillären Ebene statt, um Veränderungen in der infarzierten und nichtinfarzierten Region festzustellen. Wie erwartet wiesen die infarzierten Ventrikel im Vergleich zu denen der scheinoperierten Tiere eine Dilatation auf. Nach Auswertung der echokardiographischen Parameter zeigte sich jedoch keine Wirkung der Salicylsäure auf die linksventrikuläre Dilatation.

	Sham Placebo	Sham Aspirin	MI Placebo	MI Aspirin
n	7	8	10	6
Herzfrequenz (bpm)	508,43 ± 11,19	535,63 ± 17,48	514 ± 9,80	510 ± 10,36
papillär				
ESA [mm ²]	8,89 ± 1,67	7,90 ± 1,22	15,85 ± 2,49*	14,50 ± 1,32*
EDA [mm ²]	13,69 ± 1,78	11,99 ± 1,38	20,70 ± 2,52*	23,87 ± 2,42*
2D FS [%]	41,50 ± 3,80	44,40 ± 3,10	24,20 ± 3,4*	25,80 ± 5,40*
apical				
ESA [mm ²]	8,78 ± 3,11	7,19 ± 1,08	18,05 ± 2,62*	17,17 ± 1,88*
EDA [mm ²]	11,78 ± 2,61	11,09 ± 1,11	21,40 ± 2,48*	22,16 ± 1,79*
2D FS [%]	37,60 ± 4,30	34,40 ± 0,70	17,70 ± 3,70*	20,00 ± 4,00*

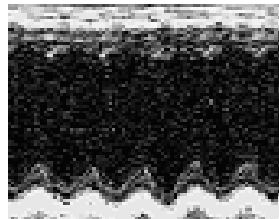
Tabelle 3:

*Echokardiographische Messungen bei scheinoperierten (Sham) und infarzierten (MI) Mäusen, die mit Placebo bzw. Aspirin behandelt wurden, vier Wochen nach dem Myokardinfarkt; die Daten sind als Mittelwerte ± SEM angegeben, *: $p < 0,05$ scheinoperierte vs. infarzierte Tiere.*

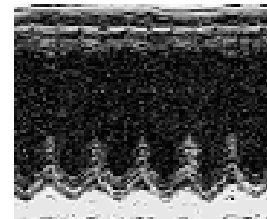
n Anzahl der Tiere; ESA endsystolische Fläche; EDA enddiastolische Fläche; FS fraktionelle Verkürzung (modifiziert nach Adamek [78])



M-Mode Sham



M-Mode MI Placebo



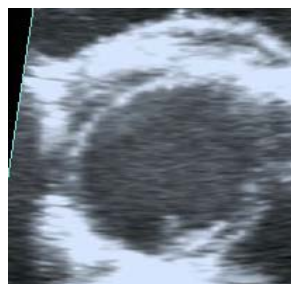
M-Mode MI Aspirin

Abbildung 37:

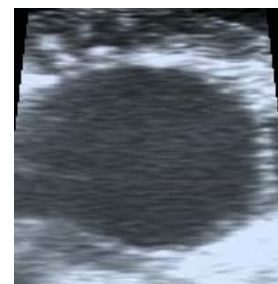
Echokardiographische Darstellung des linken Ventrikels von einem scheinoperierten (Sham), mit Placebo (MI Placebo) und mit Aspirin (MI Aspirin) behandelten Tier im M-Mode (modifiziert nach Adamek [78]).



2D Bild Sham



2D Bild MI Placebo



2D Bild MI Aspirin

Abbildung 38:

Echokardiographische Darstellung des linken Ventrikels von einem scheinoperierten (Sham), mit Placebo (MI Placebo) und mit Aspirin (MI Aspirin) behandelten Tier im 2D-Mode.

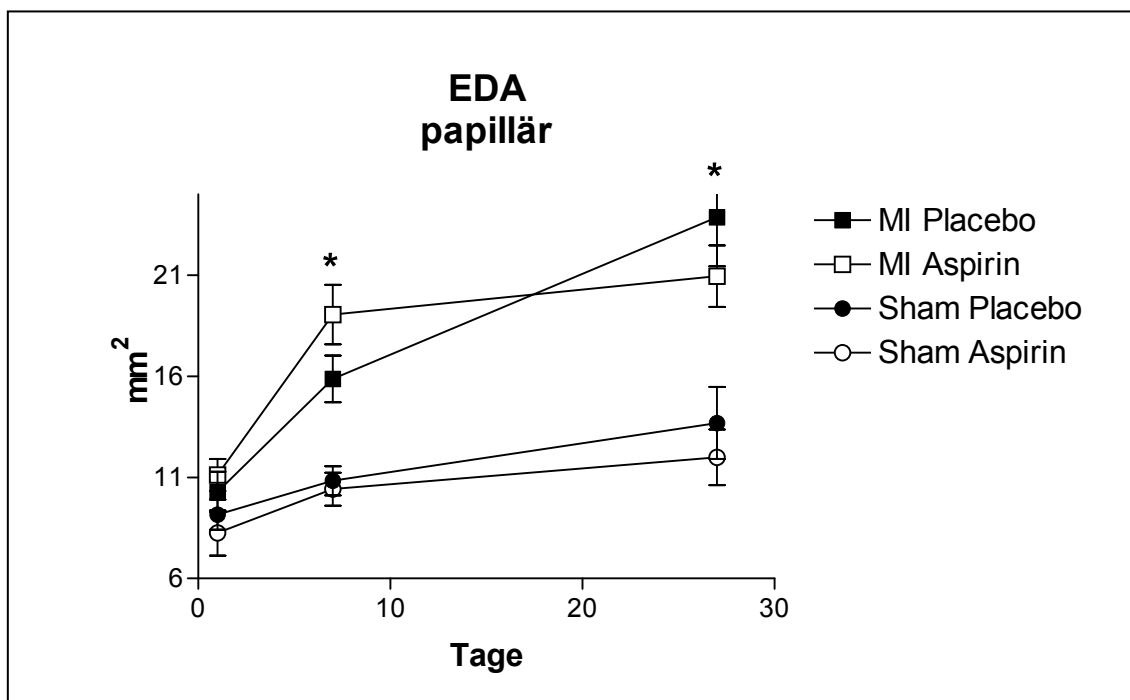
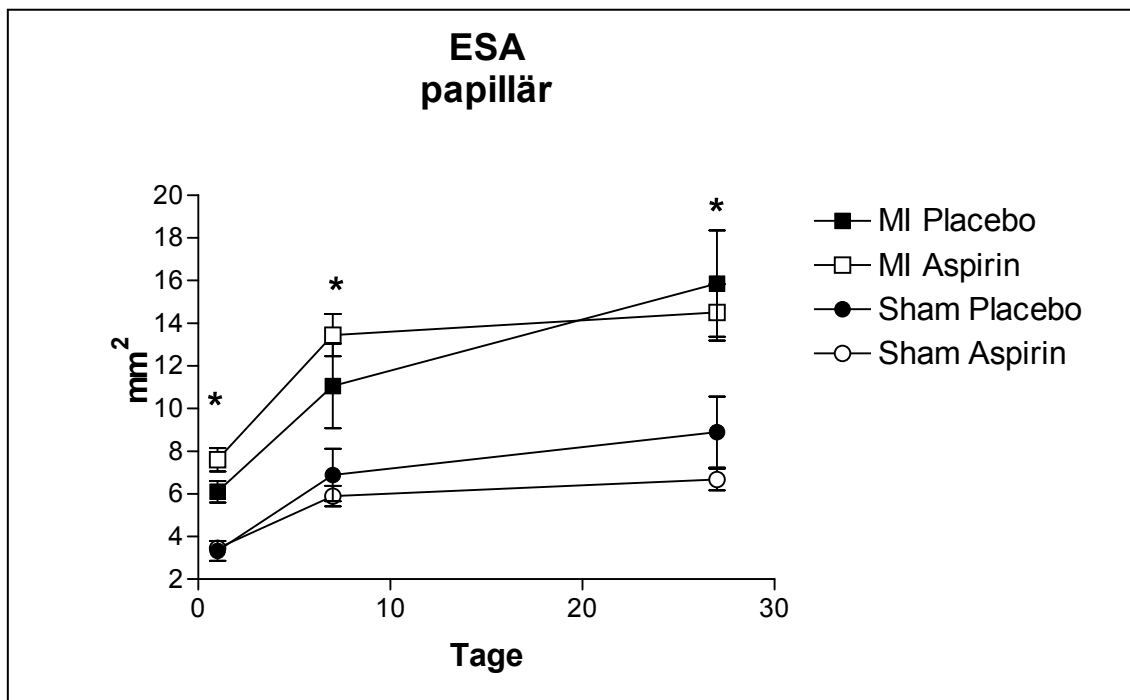


Abbildung 39:

Entwicklung der linksventrikulären Dilatation bei scheinoperierten (Sham) und infarzierten (MI) Mäusen, die mit Placebo bzw. Aspirin behandelt wurden, über vier Wochen nach Myokardinfarkt (*: $p < 0,05$ scheinoperierte vs. infarzierte Tiere).

ESA endsystolische Fläche; EDA enddiastolische Fläche (modifiziert nach Adamek [78])

7.3.3 Kollagenbestimmung

Bei der Ermittlung des Kollagengehalts in der Narbe zeigte sich kein Unterschied in den beiden Gruppen. Die mit Aspirin behandelten Tiere hatten durchschnittlich $65,35 \% \pm 5,15$, die Placebo-Tiere $62,48 \% \pm 4,55$ Kollagen in den mit Picrosiriusrot-gefärbten Gewebeproben.

Die Kollagenwerte in dem nicht-infarzierten Myokard blieben ebenfalls von der Aspirin-Therapie unberührt. Auch hier waren die Daten in den beiden Gruppen ähnlich (Placebo vs. Aspirin $0,9 \pm 0,3 \%$ vs. $1,0 \pm 1,0 \%$).

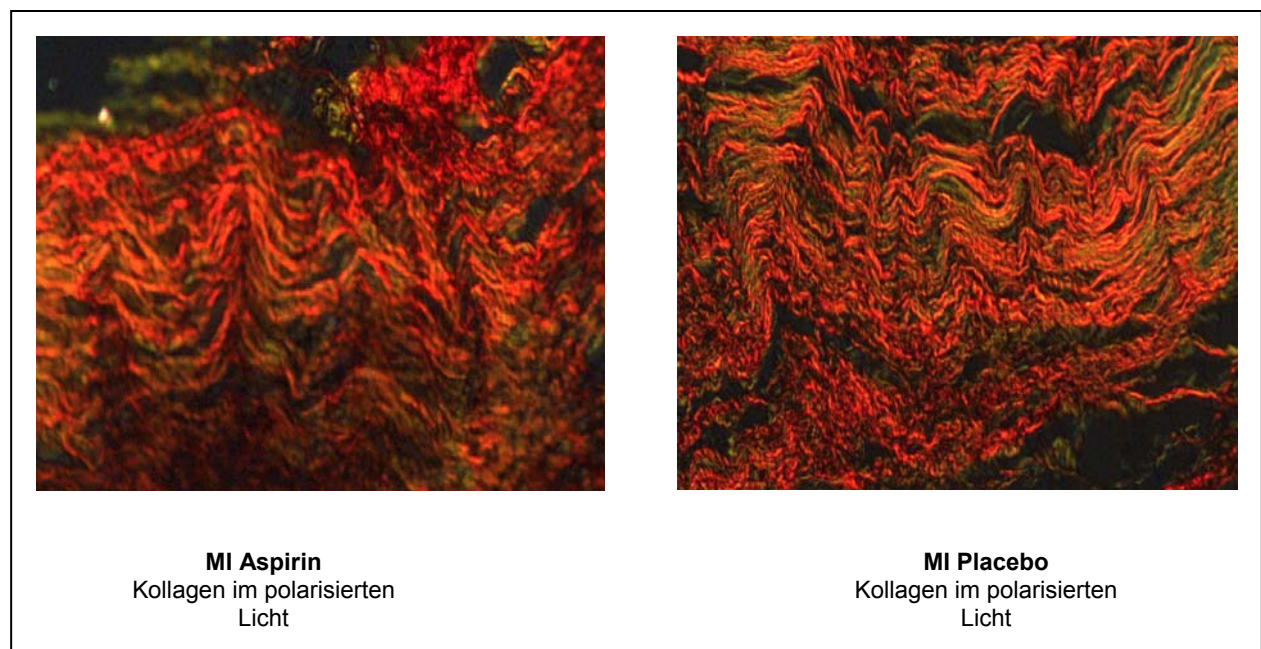


Abbildung 40:

Mit Picrosiriusrot-gefärbte Ausschnitte des infarzierten Herzens bei infarzierten (MI) Mäusen, die mit Placebo bzw. Aspirin behandelt wurden, vier Wochen nach Myokardinfarkt (modifiziert nach Adamek [78]).

7.3.4 Aktivierung von NF- κ B

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B, der im nukleären Protein mittels ELISA gemessen wurde, wies erhöhte Werte in infarzierten Herzen im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren auf. Die Aspirin-Behandlung zeigte eine teilweise Blockade des Transkriptionsfaktors, die jedoch nicht signifikant war (Placebo vs. Aspirin $0,037 \pm 0,011$ vs. $0,028 \pm 0,007$).

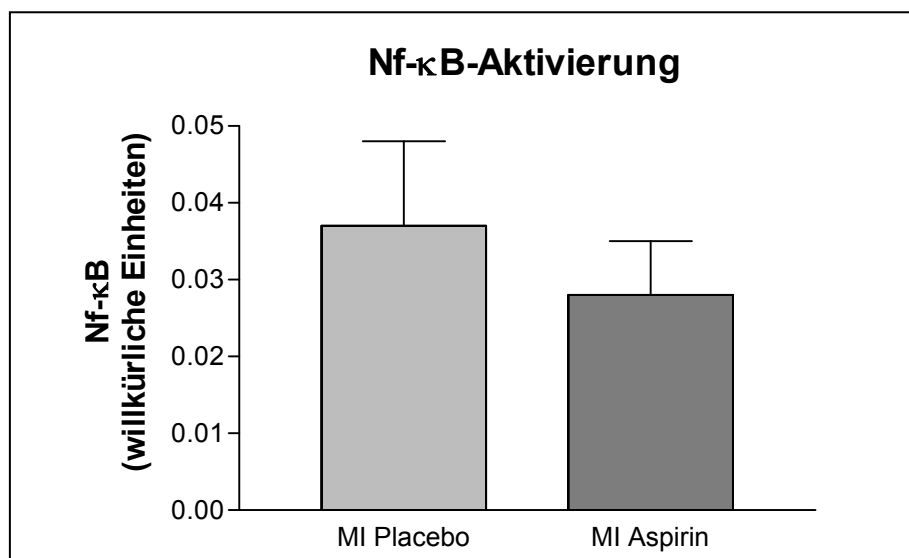


Abbildung 41:

NF- κ B-Aktivierung bei infarzierten (MI) Mäusen, die mit Placebo bzw. Aspirin behandelt wurden, vier Wochen nach Myokardinfarkt mittels ELISA ermittelt.

7.3.5 Proinflammatorische Proteine

Die Expression der proinflammatorischen Zytokine in der Herzspitze wurde auf der RNA-Ebene mit Hilfe der Real-Time-PCR-Methode bestimmt. Die Aspirinbehandlung beeinflusste die Expression von TNF- α sowie IL-1 β im hohen Maße. Die Werte der beiden Proteine wurden signifikant gesenkt, verglichen mit den Placebo-Tieren (Placebo vs. Aspirin TNF- α $3,0 \pm 0,3$ vs. $1,0 \pm 0,1$, $p = 0,0001$; IL-1 β $1,6 \pm 0,3$ vs. $0,4 \pm 0,1$; $p = 0,006$).

Die Wirkung der Salicylsäure auf die Expression der proinflammatorischen Proteine wurde ebenfalls zu früheren Zeitpunkten gemessen. Ein Tag sowie drei Tage nach der Ligatur der Koronararterie reduzierte die Therapie die TNF- α - und IL-1 β -Expression.

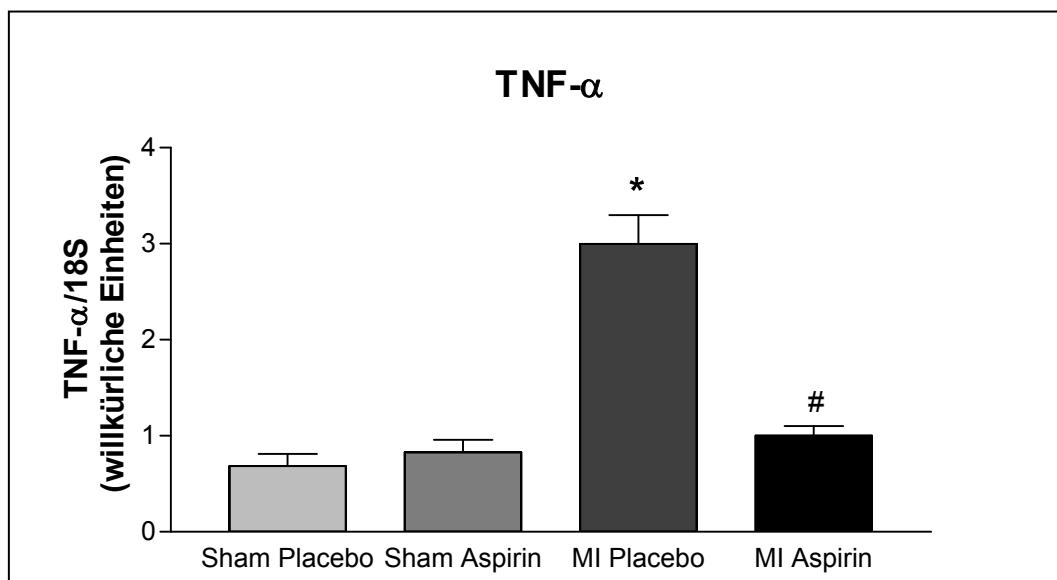


Abbildung 42:

Tumor-Nekrose-Faktor- α -Expression (TNF- α) bei scheinoperierten (Sham) und infarzierten (MI) Mäusen, die mit Placebo bzw. Aspirin behandelt wurden, mittels Real-Time-PCR mit TaqMan-Sonde ermittelt vier Wochen nach Myokardinfarkt (: $p < 0,05$ scheinoperiert vs. MI; #: $p < 0,05$ Placebo vs. Aspirin) (modifiziert nach Adamek [78]).*

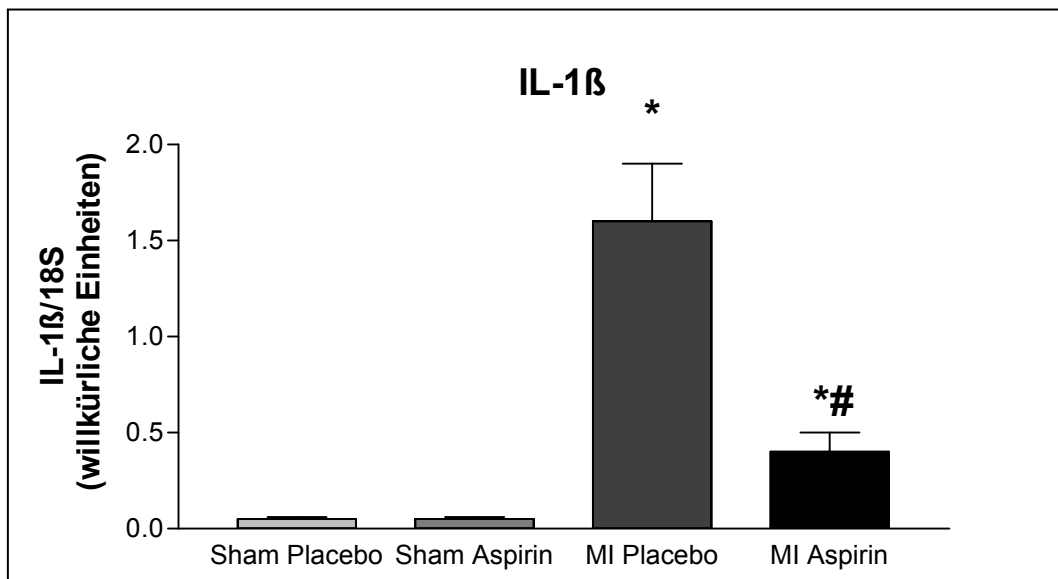


Abbildung 43:

Interleukin-1 β -Expression (IL-1 β) bei scheinoperierten (Sham) und infarzierten (MI) Mäusen, die mit Placebo bzw. Aspirin behandelt wurden, mittels Real-Time-PCR mit TaqMan-Sonde ermittelt vier Wochen nach Myokardinfarkt (*: $p < 0,05$ scheinoperiert vs. MI; #: $p < 0,05$ Placebo vs. Aspirin) (modifiziert nach Adamek [78]).

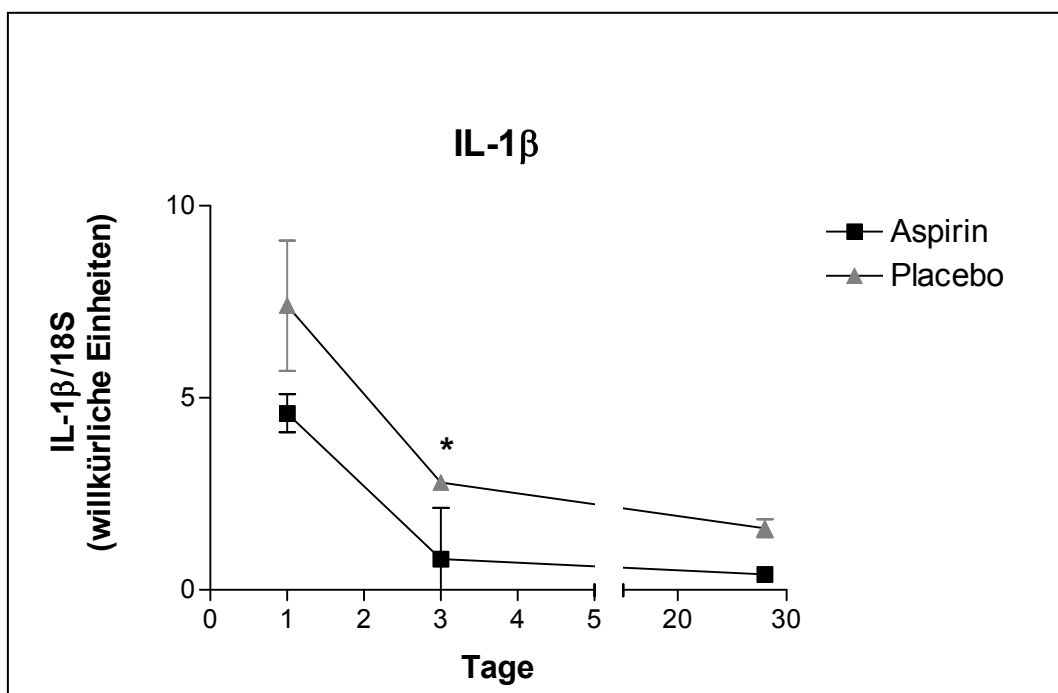
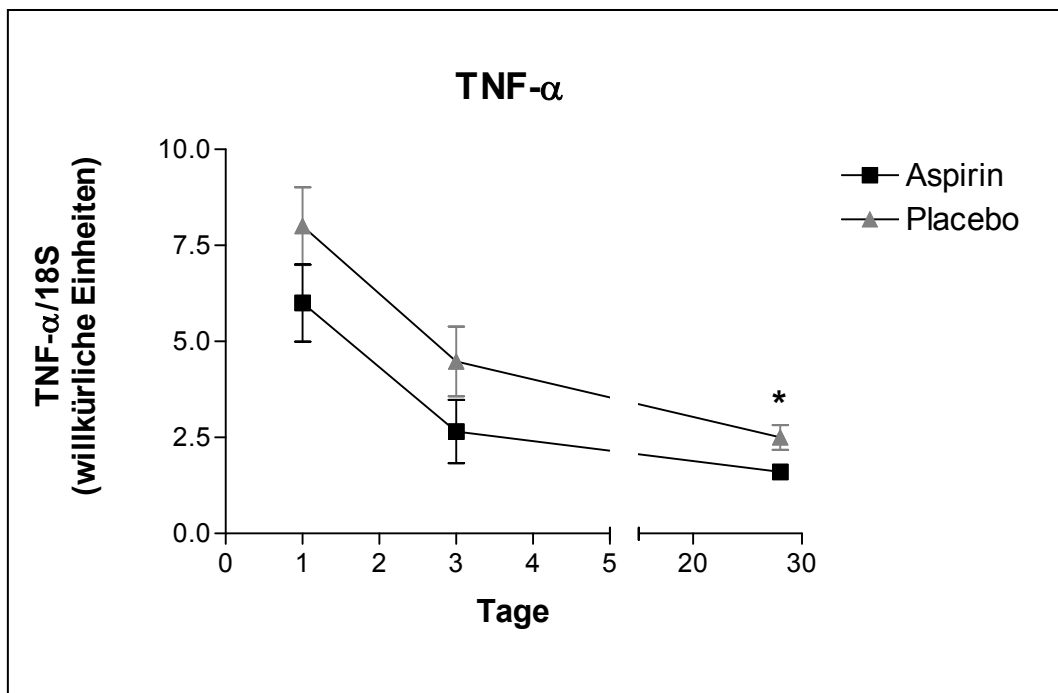


Abbildung 44:

Verlauf der Tumor-Nekrose-Faktor- α - (TNF- α) und Interleukin-1 β -Expression (IL-1 β) bei Mäusen, die mit Placebo bzw. Aspirin behandelt wurden, über vier Wochen nach Myokardinfarkt.

(*: $p < 0,05$ Placebo vs. Aspirin).

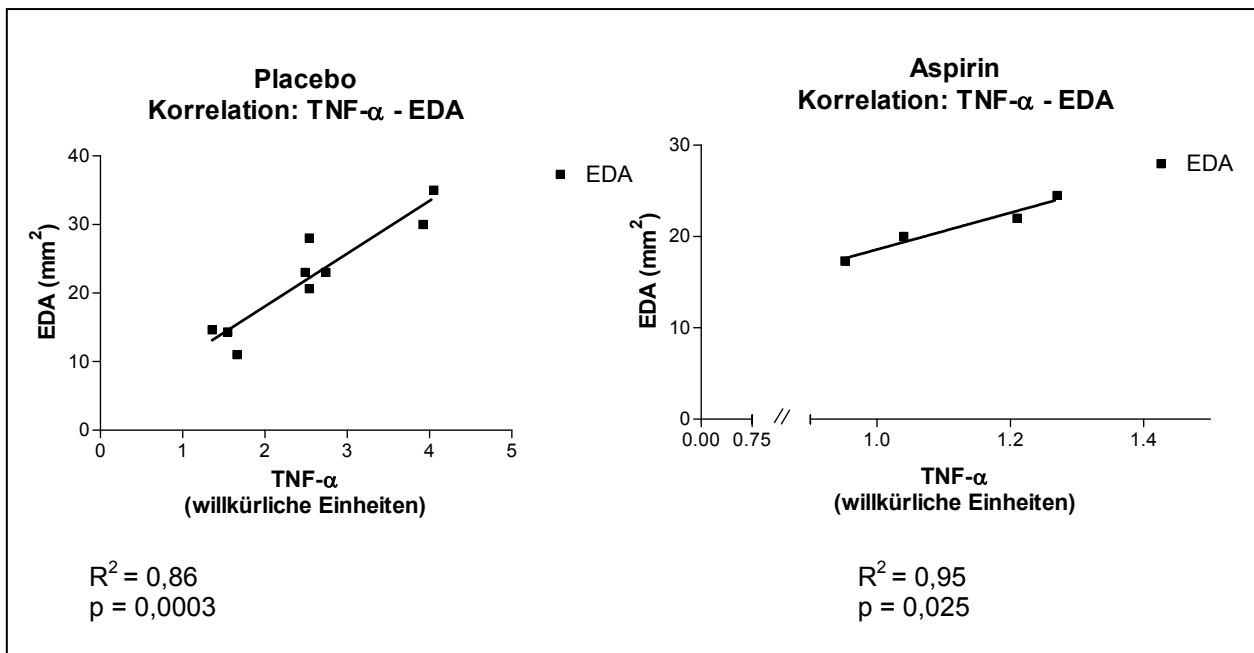


Abbildung 45:

Korrelation zwischen Tumor-Nekrose-Faktor- α -Expression (TNF- α) und enddiastolischen Fläche (EDA) bei Mäusen, die mit Placebo bzw. Aspirin behandelt wurden.

TNF- α -Expression korrelierte positiv mit dem echokardiographischen Parameter für linksventrikuläre Dilatation EDA (Placebo TNF vs. EDA R² = 0,86, p = 0,0003). Unter Aspirin-Therapie verschob sich die Korrelationskurve nach links und der Slope wurde somit reduziert (Aspirin TNF vs. EDA R² = 0,95, p = 0,025). Somit konnte gezeigt werden, dass mit der Größe des Infarktes unter Placebo-Gabe die TNF-Expression signifikant zunimmt, während die Aspirin-Therapie die Expression der proinflammatorischen Zytokine signifikant senkt.

8. Diskussion

Kardiovaskuläre Erkrankungen stehen an oberster Stelle der Todesursachen in den westlichen Industrieländern. Folglich gehört die Entwicklung von Strategien, die die myokardiale Nekrose minimieren und Reparaturprozesse nach Myokardinfarkt optimieren, zu den therapeutischen Hauptzielen in der modernen Kardiologie. Bevor eine spezifische Intervention in die Therapie umgesetzt wird, ist eine detaillierte Kenntnis der zellulären und molekularen Mechanismen in der Entzündungsantwort nach Ischämie und Reperfusion notwendig. Die vorliegende Arbeit beinhaltet im ersten Teil wichtige Aspekte von Inflammation und NO-Produktion nach Okklusion der Kranzarterie. Im zweiten Teil der Studie wurde versucht, durch Hemmung der Entzündungsprozesse Einfluss auf strukturelle und funktionelle Veränderungen in der Postinfarktphase zu erzielen.

8.1 Protektiver Effekt eines eNOS-Modulators in vivo

Die einwöchige Behandlung von Mäusen mit dem neu entwickelten eNOS-Modulator AVE 9488 führte zu einem deutlich reduzierten Myokardschaden nach Verschluss der Koronararterie mit darauf folgender Reperusionsphase. Unter dieser Therapie stieg die Expression des eNOS-Enzyms signifikant an und übte anschließend einen protektiven Effekt auf die Herzschädigung aus. Um zu überprüfen, ob dieses Präparat gezielt die Expression der endothelialen NO-Synthase beeinflusst, wurden die gleichen Versuche mit Mäusen durchgeführt, bei denen das eNOS-Gen ausgeschaltet wurde. Bei diesen Tieren zeigte die AVE 9488-Therapie keinen Erfolg. Die Infarktgröße lag hier im Bereich der Infarktausdehnung von Mäusen mit Placebo-Behandlung.

Die Rolle des Stickstoffmonoxids im Reperfusionsschaden wurde in den letzten Jahren sehr intensiv untersucht und brachte eine große Vielzahl an Ergebnissen, die jedoch nicht immer ganz einheitlich waren. Zum Beispiel konnte mit einer Infusion von L-Arginin, einem Substrat der eNO-Synthase, sowie mit einer NO-Donor-Therapie die Produktion von NO-Gas gesteigert und somit ein protektiver Effekt auf die Ischämie/Reperfusion erzielt werden [79] [80]. Zusätzlich zeigte Duranski, dass das Oxidationsprodukt von Stickstoffmonoxid, Nitrit, sich ebenfalls reduzierend auf die

Infarktgröße auswirkt. Diese Beobachtung wurde anschließend mit einem NO-Fänger bestätigt, da unter diesen Bedingungen der Benefit wieder aufgehoben war [81].

Ein weiterer wichtiger Aspekt bezieht sich auf die Behandlung von Patienten nach einer Reperfusionphase. Dabei spielt der NO-Reaktionsweg eine große Rolle und wird von einer Vielzahl Pharmaka beeinflusst. Ein Beispiel dafür ist unter anderem die Gruppe der Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer (ACE-Hemmer). Beim Einsatz von ACE-Hemmern erhöht sich die NO-Aktivität in den Gefäßen, und die stimulierende Wirkung auf die Superoxidproduktion durch Angiotensin II wird unterdrückt [82, 83]. Ebenfalls wirkt sich die Behandlung mit einem inzwischen häufig eingesetzten 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym A Reduktase Inhibitor (Statin) positiv auf koronare Ereignisse und die Sterblichkeit aus [84]. Der Grund dafür liegt in seiner antioxidativen Eigenschaft sowie in seiner Fähigkeit, die eNOS-Expression und eNOS-Aktivität zu steigern. Statine können sogar die Herunterregulierung der eNOS-Expression, die durch Hypoxie und oxidiertes LDL (low density lipoprotein) ausgelöst wurde, wieder rückgängig machen und unterstreichen somit ihre Fähigkeit, die NO-Bioverfügbarkeit in den Gefäßen zu verbessern [85]. Ein weiteres Beispiel für die Beeinflussung der NO-Aktivität stellen die Phosphodiesterase-Inhibitoren, mit dem bekannten Wirkstoff Sildenafil, dar. Dabei wird die Hydrolyse von cGMP durch gezielte Blockade des Phosphodiesterase-Enzyms 5 verhindert. Die durch NO vermittelte cGMP Wirkung kann damit über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden. Diese Wirksubstanz wird hauptsächlich in der Behandlung der erektilen Dysfunktion eingesetzt und hat sich des Weiteren in einigen Tierversuchen als kardioprotektiv erwiesen [86].

Die hier erwähnten Präparate werden erfolgreich in der Therapie der koronaren Herzkrankheiten eingesetzt. Ihr Einfluss auf die NO-Aktivität ist jedoch nicht spezifisch. Deswegen werden für die gezielte Aufklärung der Rolle der eNOS und des NO-Gases auf die Ischämie/Reperfusion gentechnisch veränderte Tiere verwendet. Zum Beispiel setzten Jones et al. in ihrer Studie Mäuse ein, die das Enzym eNOS überexprimieren und unterzogen diese einem 30 Minuten dauernden Verschluss der linken Koronararterie mit nachfolgenden 24 Reperfusionstunden. Hier führte die vermehrte eNOS-Bildung zu einer 33 %igen Reduktion der Infarktgröße bei gleicher area at risk im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen [87]. Auf der anderen Seite zeigten Mäuse, bei denen das Gen für die eNOS-Expression ausgeschaltet wurde, größere kardiale Schäden auf, welche zudem mit erhöhter Entzündungsreaktion verbunden waren [28]. Nicht

unerwähnt bleiben dürfen jedoch die Studien, in denen die gentechnische Manipulation des eNOS-Gens keine Veränderung mit sich brachte. Als Beispiel gelten hier unter anderem die Veröffentlichungen von Yang oder Sharp. Sharp et al. untersuchten in ihrem Herzschädigungsmodell zwei Arten von transgenen Mäusen. Bei beiden Modellen wurde das Enzym eNOS gentechnisch verändert. Das erste Modell (Har eNOS^{-/-}) zeichnete sich durch einen größeren Myokardschaden aus, während das zweite Modell (UNC eNOS^{-/-}) eine reduzierte Infarktgröße entwickelte. Die Ursache für dieses überraschende Phänomen konnte auf den kompensatorischen Mechanismus der vermehrten iNOS-Expression zurückgeführt werden [88]. In einer weiteren Studie versuchte die Arbeitsgruppe von Yang die Wirkung von ACE-Inhibitoren auf die Ischämie/Reperfusion bei normalen Wildtyp-Mäusen aufzuklären und diese Ergebnisse mit Werten von Mäusen zu vergleichen, bei denen das eNOS-Gen inaktiviert wurde. Erstaunlicherweise kam es durch die Genausaltung zu keiner Ausweitung der Infarktgröße. Bei beiden Mäusemodellen wurde der gleiche Myokardschaden gemessen. Ebenso konnte echokardiographisch kein Unterschied in der Auswurfraction, der Dimension des linken Ventrikels oder der Verkürzungsfraction gefunden werden. Auf der anderen Seite brachte die Behandlung mit einem ACE-Inhibitor nur bei den Wildtyp-Mäusen einen protektiven Effekt. Der Erfolg der Therapie blieb bei den eNOS KOs (eNOS^{-/-}) aus. Aus diesen Beobachtungen konnte der Schluss gezogen werden, dass der Erfolg der Therapie mit ACE-Hemmern nur in Verbindung mit dem aus dem Endothel freigesetzten Stickstoffmonoxid zu erzielen ist [89].

Zusammenfassend kann man davon ausgehen, dass die endotheliale NO-Synthase mit ihrem Produkt NO-Gas eine entscheidende Rolle in der Ischämie/Reperfusion, ihrer Prophylaxe oder Therapie spielen. Diese Hypothese wurde von den meisten Studien unterstützt.

Die hier vorgestellte Studie erzielte eine noch stärkere kardioprotektive Wirkung durch Beeinflussung der endothelialen NO-Synthase. Tatsächlich erzielte die Behandlung mit dem eNOS-Modulator AVE 9488 eine um die Hälfte reduzierte Infarktgröße. Die gentechnische Überexpression des eNOS-Enzyms brachte nur eine Reduktion um 33 %. Die Erklärung für dieses unerwartete Phänomen könnte in der permanenten Exposition der transgenen Tiere mit Stickstoffmonoxid und der eNO-Synthase liegen. Dadurch kommt es zu einer Toleranzentwicklung. Diese unerwünschte Wirkung muss

ebenso beim Einsatz NO-freisetzender Präparate, wie z. B. bei Nitroglycerin, bei Patienten mit einem Angina pectoris-Anfall berücksichtigt werden [90, 91]. Dementsprechend werden bei einer Dauertherapie so genannte nitratfreie Intervalle empfohlen.

In der vorliegenden Arbeit wurde auch die Wirkung des Wirkstoffs AVE 9488 an Mäusen getestet, bei denen die eNO-Synthase inaktiviert wurde. Hier kamen die UNC eNOS^{-/-} Tiere zum Einsatz, die bereits im Labor von Sharp et al. untersucht wurden. Nach einer Ischämie von 30 Minuten und einer Reperfusionsphase von 24 Stunden konnte keine positive Beeinflussung der NO-Aktivität gemessen werden. Die Ursache liegt wohl darin, dass der tierische Organismus einen anderen Weg gefunden hat, das Fehlen der eNOS zu kompensieren, indem sich die iNOS vermehrt an der NO-Produktion beteiligt [88].

Stickstoffmonoxid wird kontinuierlich vom Endothel freigesetzt und spielt somit eine wichtige Rolle in der Regulierung des Blutdrucks, des regionalen Blutflusses und des Gefäßtonus. Als Rezeptor-vermittelter Vasodilatator reagiert es auf Agonisten wie Acetylcholin, Bradykinin oder Thrombin. Zusätzlich verhindert das Molekül die Plättchenaggregation und -adhäsion an die Gefäßwand sowie die vermehrte Neutrophilenakkumulation, indem es mit den Adhäsionsproteinen reagiert.

Bei der einwöchigen Behandlung mit dem eNOS-Modulator konnte jedoch keine Wirkung auf die Entzündungsreaktion beobachtet werden. Zwar sah man bezüglich der TNF-Expression eine leichte Abnahme, dagegen war bei der Neutrophileninfiltration kein Effekt messbar. Diese Ergebnisse wurden ferner durch weitere Versuche mit Adhäsionsmolekülen bestätigt. Auch hier konnte die Therapie keinen Einfluss auf die ICAM- oder LIX-Expression nehmen. Der Erfolg von AVE 9488 müsste damit in der signifikanten Reduktion des oxidativen Stresses liegen. Die enorme Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies in der Reperfusionsphase verursacht, durch die zytotoxischen und gewebetoxischen Effekte, einen Untergang eines großen Myokardareals. Dieser Vorgang konnte durch die AVE 9488-Behandlung deutlich reduziert werden. Die Deaktivierung der reaktiven Substanzen oder sogar die Unterdrückung ihrer Produktion stellte bereits viele Wissenschaftler vor eine große Herausforderung, wie Becker in einer Veröffentlichung unterstrich [92]. Es gelang aber an Tiermodellen zu zeigen, dass die gezielte Ausschaltung der Radikale einen reduzierten Ischämieschaden nach sich zieht. Dabei interagiert NO direkt mit dem

mitochondrialen Reaktionweg, indem es an der Sauerstoffbindungsstelle der Cytochrom-C-Oxidase angreift. Als Folge der Interaktion mit der Elektronentransportkette kommt es zu einer reduzierten mitochondrialen Respiration und somit zur Hemmung der reaktiven Sauerstoffproduktion [93]. In der vorliegenden Studie wurde die enorme Reduzierung des oxidativen Stresses bei den behandelten Tieren mittels Malondialdehyd-Konzentration ermittelt, die als Indikator für die Lipidperoxidation gilt und somit das Ausmaß der Zerstörung der Membranintegrität darstellt. Die antioxidative Wirkung wurde aber nicht durch die verstärkte Expression der Superoxiddismutase erreicht. Zwar zählt das Enzym als Radikalfänger zum zellulären Schutzsystem, seine Expression blieb jedoch von der Therapie unberührt. Zusätzlich konnte bei der Bestimmung der Nitrotyrosinkonzentration im reperfundierten Myokard kein Unterschied gemessen werden. Nitrotyrosin entsteht aus der Reaktion von Peroxynitrit mit Aminosäuren, Peroxynitrit wiederum aus der Reaktion von NO mit Superoxidradikalen, die bei der Ischämie/Reperfusion vermehrt gebildet werden. Die Bestimmung von Peroxynitrit in vivo ist bis dato nicht möglich und bezieht sich nur auf die Messung des Endproduktes Nitrotyrosin mittels ELISA oder Immunohistochemie. Beide Methoden detektieren aber nicht nur das durch Peroxynitrit entstandene Nitrotyrosin, sondern auch das durch andere Quellen wie Chloridionen, Myeloperoxidase oder weitere nitrierende Radikale hervorgerufene Nitrierungsprodukt [94, 95]. Demnach kann bei diesem Ergebnis nicht auf die entstandene Peroxynitritmenge geschlossen werden.

Somit bedarf es weiterer Untersuchungen, um die Reaktionswege zu ermitteln und die Bereiche aufzuklären, in die diese Substanz eingreift. Zusätzlich ist die dauerhaft erhöhte eNOS-Expression und damit die verbundene NO-Konzentration im Organismus zu beachten. Normalerweise wird NO durch O_2 bzw. HbO_2 zu Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) oxidiert, wobei auch Methämoglobin anfällt. Werden im Gewebe reaktive Sauerstoffspezies wie das Superoxid-Anion gebildet, wirkt NO durch Bildung von Peroxynitrit als Fänger des hochtoxischen Sauerstoffradikals [96]. Kleinere Mengen Peroxynitrit können rasch durch Umwandlung zu Nitrat problemlos entsorgt werden. Bei Anfall sehr großer NO-Mengen werden die Eliminationswege überlastet. NO wird dann zu höhergradigen Stickstoffoxiden oxidiert, welche – obwohl ebenfalls nur kurz wirksam – ein hohes zytotoxisches Potential besitzen. Wenn, was bei Ischämie oder Entzündungen zu erwarten ist, auch vermehrt O_2 -Radikale anfallen, wird auch der

erwähnte Weg zum Peroxynitrit forciert, so dass dieses Molekül akkumuliert. Dieses aggressive Molekül richtet sich gegen die eigenen Zellen und zerstört damit die körpereigenen Lipide und Proteine.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die neu entwickelte Substanz AVE 9488 als oral bioverfügbare Substanz die eNOS-Expression im Herzen verstärkt und die Ischämie-/Reperfusionsschädigung reduziert. Als eNOS-Aktivitätsverstärker wäre das Präparat ein viel versprechendes therapeutisches Mittel bei der Ischämie/Reperfusion. Es bedarf weiterhin einiger Untersuchungen, um die Dosis und Dauer der Behandlung zu ermitteln, damit die Bildung zytotoxischer Spezies vermieden werden kann.

8.2 Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B in der Ischämie/Reperfusion

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die Funktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B in einem Ischämie-/Reperusionsmodell im Herzmuskel zu klären. Dafür wurden Mäuse, denen die NF- κ B-Untereinheit p50 auf gentechnischem Weg ausgeschaltet wurde, verwendet und mit Wildtyp-Mäusen verglichen. Nach einer 30-minütigen Okklusion und einer 24-stündigen Reperusionsphase wiesen die genveränderten Mäuse eine signifikant kleinere Infarktgröße im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren auf. Dieser Schutz war jedoch nicht mehr bei den p50 KO-Mäusen gegeben, denen Knochenmarkzellen von Wildtyp-Mäusen transplantiert wurden. Diese Beobachtung lässt die Schlussfolgerung zu, dass die NF- κ B-Aktivierung in den Knochenmarkzellen eine entscheidende Rolle bei der Ischämie/Reperfusion im Herzen spielt.

Es ist bereits seit längerer Zeit bekannt, dass NF- κ B als multifunktionaler und allgegenwärtiger Transkriptionsfaktor an der Regulierung einer Vielzahl von Genexpressionen beteiligt ist, die insbesondere zu einer Entzündungsreaktion führen [48]. Dazu gehören Chemokine, Zytokine sowie einige Wachstumsfaktoren [97]. Diese Faktoren wiederum sind ebenso fähig, NF- κ B zu aktivieren. Der Einfluss von NF- κ B bei Ischämie/Reperfusion wurde bereits in einigen Publikationen beschrieben, ebenfalls ihre erhöhte Aktivierung bei Patienten mit instabiler Angina pectoris [98]. Somit gilt die Hemmung von NF- κ B als attraktiver Ansatzpunkt für die Unterdrückung der Immunantwort während der ischämischen Schädigung [99].

Mit dieser Fragestellung beschäftigten sich einige Forschungsgruppen. Sie versuchten entweder durch einen molekularen [100] oder pharmakologischen Ansatz [101] die NF- κ B-Aktivierung zu unterdrücken und damit die funktionellen Konsequenzen zu untersuchen. Die globale Ausschaltung des Transkriptionsfaktors führte zwar in beiden Fällen zu einer Reduzierung des entstandenen Ischämieschadens, die Umsetzung in den klinischen Alltag ist jedoch sehr fraglich. Das toxische Potential ist hoch, so dass eine Patientenstudie fraglich erscheint. Die molekulare Inhibierung durch Ausschalten der p65-Untereinheit [52] sowie der pharmakologische Versuch einer Hemmung des I κ B-Kinase-Komplexes [102] führten zur embryonalen Letalität.

Im Gegensatz zu den erwähnten Studien zeichnen sich die hier untersuchten Mäuse nur durch geringe Anormalitäten im Phänotyp aus. Das gezielte Ausschalten der p50-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- κ B macht sich lediglich in kleineren immunologischen Defekten bemerkbar [53]. Die Mäuse durchlaufen aber eine normale embryonale Entwicklung. Diese molekulare Veränderung schützt sie erheblich vor einer Ausweitung der Myokardschädigung nach einer 30-minütigen Ischämie mit nachfolgender Reperfusionphase. Diese fällt über 50 % geringer aus als bei den entsprechenden Kontrolltieren. Somit zeigen die hier erhobenen Daten ganz deutlich, dass durch eine gezielte Ausschaltung der p50-Untereinheit, eine Reduktion des ischämischen Schadens erreicht werden kann.

Ein weiterer protektiver Aspekt der Ausschaltung der p50-Untereinheit wurde kürzlich von der Arbeitsgruppe Frantz et al. berichtet [99]. Hier standen die Remodelingprozesse nach Verschluss einer Koronararterie bei p50 defizienten Mäusen im Mittelpunkt der Untersuchung. Nach einem achtwöchigen Beobachtungszeitraum fand die Gruppe eine signifikant reduzierte Dilatation und eine bessere Kontraktilität des linken Ventrikels bei KO-Tieren im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen. Somit gilt NF- κ B als ein attraktiver Ansatzpunkt für die positive Beeinflussung der Umbauprozesse im linken Ventrikel und für die Behandlung einer chronischen Herzinsuffizienz.

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist an der Regulierung vieler Gene beteiligt, die während der Ischämie/Reperfusion als Hauptakteure im proinflammatorischen Geschehen gelten und die Anlockung weiterer Entzündungszellen verstärken. Wichtige Vertreter sind hier z. B. die neutrophilen Granulozyten, die verstärkt in das geschädigte Gewebe einwandern [47]. Diese Leukozyten werden durch verschiedene Faktoren als Folge der Ischämie/Reperfusion aktiviert. Dazu zählen das Komplementfragment C5a, die

Zytokine TNF, IL-1 und IL-6, das Neutrophil Activating Peptide (NAP-1), der Platelet Activating Factor (PAF) und das Macrophage Inflammatory Protein-2 (MIP-2) [47]. Die Leukotriene B4 (LTB4) gelten als stärkster Chemotaxis- und Aktivierungsfaktor [103]. Erst einmal aus den Kardiomyozyten und Endothelzellen freigesetzt, sorgen sie für die gezielte Einwanderung der Neutrophilen in das geschädigte Gewebe und werden wiederum von diesen Zellen vermehrt gebildet. Somit wird die Anlockung weiterer Leukozyten aufrechterhalten.

Die aktivierten Neutrophilen setzen anschließend viele proteolytische Enzyme frei, die die extrazelluläre Matrix umbauen, und sind vorwiegend an der Generierung gewebetoxischer Radikale beteiligt [47]. Diese reaktiven Mediatoren hemmen folglich viele lebensnotwendige Enzyme, zerstören die Membranintegrität und verursachen somit eine Infarktausweitung.

Einige Wissenschaftler haben sich bereits mit der Fragestellung auseinandergesetzt, inwieweit die Unterdrückung der Leukozyteninfiltration bei Ischämie/Reperfusion die Infarktgröße beeinflusst. So wurde in Studien mit antineutrophilem Serum, Leukozytenfiltern und anderen Interventionen, die zu einer Reduktion der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten führten, eine Reduzierung der Infarktgröße nachgewiesen [47].

Somit stellt sich die Frage, ob durch eine Hemmung der NF- κ B-Aktivierung ähnliche Effekte erzielt werden können. Die Inhibierung des Transkriptionsfaktors führt zu einer Herunterregulierung der proinflammatorischen Zellen, wodurch weniger neutrophile Granulozyten in das geschädigte Areal einwandern. Tatsächlich zeigten bereits einige Studien einen geringeren Einstrom der Entzündungsmediatoren nach vorausgegangener Hemmung von NF- κ B [100, 101, 104].

Die hier vorliegende Arbeit bestätigt diese Beobachtung. Auch hier wurden im Myokard der genveränderten Tiere signifikant weniger Leukozyten nach der Herzschädigung gefunden als in den Wildtyp-Mäusen. Dieser Aspekt liefert die Erklärung für den protektiven Effekt bei den p50 KO-Mäusen.

Umso erstaunlicher ist die Tatsache, dass trotz der niedrigen Leukozyteninfiltration die Expression der Proteine, die für die Akkumulation der neutrophilen Granulozyten verantwortlich sind, bei den KO-Tieren erhöht war. Dazu zählen das Adhäsionsmolekül ICAM-1, das Chemokin LIX sowie das Zytokin TNF- α . Über die vermehrte Expression der proinflammatorischen Mediatoren bei den p50 KO-Mäusen wurde kürzlich von

weiteren Gruppen berichtet [99, 105, 106]. Hier konnte bei den oben genannten Tieren, die entweder unter einer Myokardhypertrophie oder einer Kardiomyopathie litten oder einen Myokardinfarkt durchliefen, eine höhere Expression der Entzündungsproteine gemessen werden. Die Erklärung für das hier beobachtete Phänomen liefert die unterschiedliche transkriptionelle Aktivität der p50-p65 Heterodimere und p50-p50 Homodimere [107]. Durch die chronische Exposition der Entzündungsmediatoren kommt es zur Verschiebung des Gleichgewichts von den transkriptionsaktiven Heterodimeren zugunsten der transkriptionsinaktiven Homodimeren, die als negativer Feedback-Mechanismus agieren und dadurch die weitere Produktion von proinflammatorischen Proteinen verhindern.

Das Fehlen dieses Mechanismus in den p50 KO-Mäusen dürfte für die vermehrte Expression dieser Entzündungszellen verantwortlich sein. Auf der anderen Seite sind diese Faktoren mit einer Verstärkung des Entzündungsgeschehens und konsekutiv mit einer Infarktausweitung verbunden [108] und können hier nicht als Schutzeffekt nach Ischämie/Reperfusion bei den genveränderten Mäusen gelten.

Aufgrund der erhöhten Expression Leukozyten anlockender Proteine bei zugleich aber signifikant erniedrigter Anzahl in das geschädigte Gewebe eingewanderter Zellen wurde die Hypothese aufgestellt, dass die aktivierten Entzündungszellen in den p50 KO-Mäusen für die protektiven Effekte verantwortlich sind. Bereits frühere Berichte erwähnten funktionelle Defekte der Entzündungszellen bei p50 KO-Mäusen, die sich besonders auf die T-Zellen-abhängige Immunantwort bezogen [53, 109]. Aber auch die B-Zellen sind von dieser Schwäche betroffen. So kommt es trotz Kontaktes mit bakteriellen Lipopolysacchariden weder zu Proliferation dieser Zellen noch zu Antikörperproduktion [53]. In der Tat ist in vitro die Zelladhäsion beeinflusst, in vivo konnte der protektive Effekt in den p50 KO-Mäusen nach Transplantation von Wildtyp-Knochenmarkzellen in den globalen p50 KO aufgehoben werden.

Ein direkter Einfluss durch die Knochenmarktransplantation konnte bei den Versuchen mit p50 KO-Knochenmark, das in die bestrahlten p50 KO-Mäuse transplantiert wurde, nicht beobachtet werden. Diese Tiere verhielten sich nach den Ischämieversuchen ähnlich wie die p50 KO-Mäuse, die zuvor nicht bestrahlt wurden. Somit kann man davon ausgehen, dass die Ausschaltung der p50-Untereinheit in den Blutzellen für den protektiven Effekt verantwortlich ist.

Allerdings darf man die Grenzen dieser Studie nicht unerwähnt lassen. Obwohl hier und auch in anderen Forschungsgruppen [110] kein direkter Einfluss von Knochenmarktransplantation auf die folgende Ischämie-/Reperfusionsschädigung gefunden wurde, kann dieser nicht ausgeschlossen werden. Weiterhin wurden trotz guter Kontrolle der Versuche keine Experimente mit Knochenmarktransplantation in den Kontrolltieren durchgeführt. Nichtsdestotrotz weisen alle durchgeführten in vitro- wie auch die in vivo-Ergebnisse auf Schutzeffekte infolge der Ausschaltung des p50-Gens in den Zellen, die im Knochenmark entstehen, hin.

Als Schlussfolgerung kann man davon ausgehen, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B eine wichtige Rolle in den Ischämie-/Reperfusionsvorgängen spielt und somit einen großen Teil zum Ausmaß des entstandenen Infarktes beiträgt. In der vorliegenden Arbeit wurde deutlich der Zusammenhang zwischen eingeschränkter NF- κ B-Aktivierung in den p50 KO-Leukozyten nach vorangegangener Myokardschädigung und der signifikant reduzierten Infarktausweitung bei den p50 KO-Mäusen herausgestellt. Somit könnte die NF- κ B-Untereinheit p50 als interessantes Target in der Arzneimittelentwicklung weiterverfolgt werden.

8.3 Hochdosierte Aspirin-Behandlung und linksventrikuläres Remodeling nach Myokardinfarkt

Die hier vorliegende Studie beschäftigte sich mit der Fragestellung, ob durch eine Hemmung der proinflammatorischen Zytokine ein positiver Einfluss auf das linksventrikuläre Remodeling nach einem Myokardinfarkt erzielt werden kann. Als Substanz diente das in der Klinik bewährte Aspirin, welches über einen Zeitraum von vier Wochen nach Verschluss einer Koronararterie mit Hilfe von osmotischen Pumpen als Infusion verabreicht wurde. Nach diesem Beobachtungszeitraum wurden die echokardiographischen, hämodynamischen sowie molekularbiologischen Parameter von Tieren mit ähnlichen Infarktgrößen analysiert und mit Tieren, die eine Placeboinfusion erhielten, verglichen. Es zeigte sich, dass eine Aspirin-Therapie die Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-1 β signifikant reduziert. Der protektive Effekt auf das linksventrikuläre Remodeling blieb trotz der unterdrückten Entzündungsreaktion jedoch aus [78].

Niedrigdosiertes Aspirin wird als Standardtherapeutikum in der primären und sekundären Prophylaxe eines Myokardinfarktes bereits seit vielen Jahren eingesetzt. Es blockiert die Thrombozytenaggregation und die Thrombusbildung, indem es die Cyclooxygenase-1 an der Aminosäure Serin in den Thrombozyten irreversibel acetyliert. Dieses Enzym wird für die Bildung der proaggregatorischen und vasokonstriktorischen Thromboxane benötigt. Während diese Wirkung mit einer niedrigen Dosis Aspirin erzielt werden kann, wendet man zur Hemmung der Entzündungsreaktion höhere Konzentrationen an. Hier greift die Substanz nicht nur an der COX-1, sondern auch an der zweiten Isoform COX-2 an und verhindert somit die Umwandlung der Arachidonsäure in proinflammatorische Prostaglandine sowie in vasodilatatorische Prostacycline.

Ein weiteres wichtiges *in vivo* wie auch *in vitro* nachgewiesenes Angriffsziel hoher Aspirin-Dosen ist die Unterdrückung der Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen. Zum Beispiel wurde die Entzündungsreaktion in Zellen nach einer Aspirin-Behandlung gehemmt [111] oder die Spiegel des Entzündungsmarkers C-reaktives Protein (CRP) bei Patienten nach einem Myokardinfarkt unter Aspirin-Therapie signifikant gesenkt [112]. Die vorliegende Studie bestätigt die früheren Erkenntnisse. Hier wurden ebenfalls signifikant reduzierte Werte für die Produktion der Entzündungsmarker ermittelt.

Man geht davon aus, dass proinflammatorische Zytokine, die nach dem Myokardinfarkt hochreguliert werden, in hohem Maße zur Entstehung der Herzinsuffizienz und zu ihrem weiteren Fortschreiten beitragen [65, 113]. Nach der Aktivierung des Immunsystems durch verschiedene Stimuli, wozu z. B. Ischämie, Produktion oxidativer Modulatoren, mechanische Deformation sowie Zytokine gehören, kommt es zu einer weiteren verstärkten Expression dieser Entzündungsmarker. Diese sind anschließend an der Apoptose von Kardiomyozyten, am Remodeling der extrazellulären Matrix, der Modulation der Kontraktilität und der Anlockung weiterer Entzündungszellen beteiligt [114]. Diese Beobachtungen ließen die Hypothese zu, dass eine Hemmung der Entzündungsantwort sich protektiv nach einem Myokardinfarkt auswirken könnte. Zur Prüfung dieser Annahme bietet sich das altbewährte Aspirin an. Die Substanz ist für die Unterdrückung der Aktivierung des Immunsystems bekannt.

Überraschenderweise blieb in der vorliegenden Studie eine schützende Wirkung auf das linksventrikuläre Remodeling trotz enormer Senkung der Expression

proinflammatorischer Zytokine infolge einer Aspirin-Therapie jedoch aus. Die Bestimmung der beiden Entzündungsmodulatoren TNF und IL-1 β ergab, dass die Expression bereits einen Tag nach dem Myokardinfarkt durch Aspirin sehr stark reduziert wurde. Am dritten Tag, an dem die Expression normalerweise ihren Höhepunkt erreicht, wurde eine noch stärkere Hemmung gemessen, die nach vier Wochen am stärksten ausgeprägt war.

Der prozentuale Anteil am Kollagen in der Narbe und im nicht-infarzierten Gewebe, hämodynamische Messung sowie die kardiale Pumpfunktion, die echokardiographisch ermittelt wurde, blieben jedoch unberührt von der Reduktion des Entzündungsprozesses.

Bereits einige weitere Gruppen, die den Effekt von Aspirin in Herzschädigungsmodellen untersuchten, erzielten vergleichbare Ergebnisse. Dabei konnten weder bei Kalkman et al., Schoenmaker et al. noch bei van Kerckhoven et al. protektive Einflüsse auf die Remodelingprozesse beobachtet werden [115-117]. Zusätzlich brachte die Behandlung mit hochdosiertem Aspirin bei ischämischem Präkonditionieren ebenfalls keine Verbesserung des Myokardzustandes [118]. Auch die Hypothese, dass ein klarer Zusammenhang zwischen einer Aspirin-Therapie bei Patienten und einer Reduktion des Herzinsuffizienzrisikos besteht, wurde wieder verworfen [119].

Nichtsdestotrotz ist es verwunderlich, dass eine so starke Hemmung der Entzündungsreaktion keinerlei Verbesserung der Myokardfunktion zeigt. Unter Betrachtung der Studie von Muller et al. könnte die Aspirin-Dosis eine mögliche Erklärung liefern. Muller et al. setzten bei ihrer Studie mit Ratten 600 mg/kg KG Aspirin über 7 Wochen ein und konnten damit eine durchschnittliche Plasmakonzentration von 1-2 mM messen [120]. Diese Dosis reichte aus, um Hypertrophie und Fibrose zu reduzieren und somit einen Angiotensin II induzierten Organschaden und letztlich sogar die Mortalität zu senken. Zwar erscheint die von Muller et al. eingesetzte Aspirin-Dosis effektiver zu sein, die hier eingesetzten 120 mg/kg KG reichten jedoch bei weitem aus, um die Expression von proinflammatorischen Zytokinen signifikant zu senken.

Das starke Interesse, die Rolle der Entzündungsmarker in der Herzinsuffizienz aufzuklären, wurde zum Anlass genommen, einige in vivo-Modelle mit genveränderten Mäusen zu entwickeln. So führte zum Beispiel die Überexpression des proinflammatorischen Entzündungsmarkers TNF- α bei Mäusen zu einer Myokardhypertrophie und folglich zur Entstehung einer Herzinsuffizienz, welche mit

einer Herzinsuffizienz im Rahmen einer humanen Kardiomyopathie vergleichbar war [121, 122]. Auch die systemische Infusion mit einem rekombinanten TNF- α Faktor schwächte die Funktion des linken Ventrikels und endete in seiner Dilatation [123]. Diese Beobachtung führte zu den ersten Studien mit entzündungshemmenden Substanzen, die von einer dramatischen Verkleinerung der Infarktgröße in Tiermodellen berichteten. Die Umsetzung dieser Strategie im klinischen Alltag blieb jedoch erfolglos. Das Experiment mit Methylprednisolon bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt endete in einer Katastrophe [124], indem es zur Ausweitung der Infarktgröße und zur Arrhythmien führte. Hier hemmte die Therapie mit Kortikosteroiden zwar die Entzündungsprozesse, unterdrückte andererseits aber die Heilung und Kollagenbildung. Die gezeigten Ergebnisse betonen die Notwendigkeit, die zellulären und molekularen Vorgänge während der Inflammation besser aufzuklären. Eine entzündungshemmende Therapie darf somit den Heilungsprozess nicht beeinträchtigen.

Auf der anderen Seite gehen einige Wissenschaftler von einer schützenden Wirkung der proinflammatorischen Zytokine nach erfolgter Myokardschädigung aus. Ihren Forschungsergebnissen nach beteiligen sich die Entzündungsfaktoren verstärkt an der Regenerierung geschädigter Myokardkomponenten wie Blutgefäßen und Kardiomyozyten. Die frühere Annahme, dass das geschädigte Gewebe durch eine Narbe ersetzt wird, wurde durch die aktuellen Hinweise widerlegt, wonach davon ausgegangen wird, dass das Herz zu einer spontanen Erholung der erwähnten Komponenten fähig ist. Dabei könnten den Entzündungsfaktoren die wichtige Aufgabe zukommen, Stammzellen verstärkt aus dem Blut in das Heilungsgebiet anzulocken und dadurch positive Umbauprozessen zu begünstigen [125].

Darüber hinaus ist die Enzymselektivität von Bedeutung. Einige Studien berichten von protektiven Effekten der COX-2-Inhibitoren nach dem Myokardinfarkt. Zum Beispiel fanden Saito et al. eine verbesserte Myokardfunktion nach Ligatur einer Koronararterie in Ratten, die mit selektiven COX-2-Hemmern behandelt wurden [126]. In diesen Tieren wurden kleinere Infarkte gemessen und - im Vergleich zu Tieren, die mit unterschiedlichen Dosen von Aspirin behandelt wurden - eine Verbesserung der Kontraktion festgestellt.

Abschließend kann man davon ausgehen, dass Entzündungsprozesse eine wichtige Rolle im linksventrikulären Remodeling spielen. Die protektiven Effekte blieben bei dieser Studie trotz signifikanter Hemmung der TNF- und IL-1 β -Expression nach dem

Myokardinfarkt aus, spiegeln aber die Komplexität beim Eingriff in die Entzündungskaskade wider. Während Aspirin sehr erfolgreich bei der Therapie vieler mit Inflammation zusammenhängender Krankheiten eingesetzt wird, brachte der Einsatz nach Verschluss einer Herzkranzarterie keinen Benefit. Somit muss man bei Zytokinen als therapeutisches Target besonders auf den Behandlungszeitpunkt, die richtige Dosierung und die Selektivität achten. Es ist anzunehmen, dass der ausbleibende Effekt auch mit dem Zeitpunkt der Behandlung zusammenhängt, da eine frühe Therapie die Heilung der Infarktnarbe beeinflusst.

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine hochdosierte Aspirin-Therapie in der frühen Phase nach dem Myokardinfarkt nicht zur Verbesserung der kardialen Umbauprozesse führte, obwohl die proinflammatorischen Zytokine signifikant reduziert wurden. Nichtsdestotrotz sind weitere Versuche von großer Bedeutung, um die genauen Effekte von Aspirin im Rahmen der Herzinsuffizienz aufzuklären.

9. Abkürzungen

AAR	Area at Risk
ABC	Avidin-Biotin-Complex
ACE	Angiotensin Converting Peptide
ANP	Atrial natriuretic peptide
BNP	Brain natriuretic peptide
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	Complementary DNA
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
CR-3	Komplementrezeptor-3
DAB	Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDA	Enddiastolische Fläche
EDD	Enddiastolischer Durchmesser
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
ESA	Endsystolische Fläche
ESD	Endsystolischer Durchmesser
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FLAP	5-Lipoxygenase aktivierendes Protein
FMN	Flavin-Mononukleotid
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FS	Fractional shortening = linksventrikuläre Verkürzungsfraction
GTP	Guanosintriphosphat
HETE	Hydroxyeicosatetraenoic acid
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraenoic acid
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
I/R	Ischämie/Reperfusion
IC50	Die Konzentration eines Inhibitors, mit der halbmaximale Hemmung erfolgt
ICAM	Intracellular adhesion molecule
IKK β	IkappaB-Kinase β
IL-1 β	Interleukin-1 β
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase

KHK	Koronare Herzkrankheiten
KO	Knock Out
LDL	Low Density Lipoprotein
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen-1
LIX	LPS-induced CXC-Chemokine
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVSP	Linksventrikulärer systolischer Druck
MDA	Malondialdehyd
MIP-2	Macrophage Inflammatory Protein
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Messenger-RNA
NADPH	Nicotin-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Hydrolase
NAP-1	Neutrophil Activating Peptide
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
NO	Stickstoffmonoxid
PAF	Platelet Activating Factor
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule I
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
sGC	Guanylatcyclase
SOD	Superoxiddismutase
TBA	Thiobarbitursäure
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TTC	Triphenyltetrazolium Chlorid
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule I
WT	Weight

10. Publikationsliste

Frantz, S., Hu, K., Bayer, B., Gerondakis, S., Strotmann, J., Adamek, A., Ertl, G., Bauersachs, J. (2006) Absence of NF- κ B subunit p50 improves heart failure after myocardial infarction. **FASEB J.** 20, 1918-20.

Adamek, A., Hu, K., Bayer, B., Wagner, H., Ertl, G., Bauersachs, J., Frantz, S. (2007) High dose aspirin and left ventricular remodeling after myocardial infarction: Aspirin and myocardial infarction. **Basic Res Cardiol**, 102, 334-340.

Adamek, A., Jung, S., Dienesch, C., Laser, M., Ertl, G., Bauersachs, J., Frantz, S. (2007) Role of 5-lipoxygenase in myocardial ischemia-reperfusion injury in mice. **Eur J Pharmacol**, 571, 51-54.

Frantz, S., Tillmanns, J., Kuhlencordt, P.J., Schmidt, I., Adamek, A., Dienesch, C., Thum, T., Gerondakis, S., Ertl, G., Bauersachs, J. (2007) Tissue-Specific Effects of the Nuclear Factor κ B Subunit p50 on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. **Am J Pathol.**, 171, 507-512.

Frantz, S., Hu, K., Adamek, A., Wolf, J., Sallam, A., Maier, S. K., Lonning, S., Ling, H., Ertl, G., Bauersachs, J. (2008) Transforming growth factor beta inhibition increases mortality and left ventricular dilatation after myocardial infarction. **Basic Res Cardiol**, 103, 485-492.

11. Literatur

1. Kelley, S.T., et al., *Restraining infarct expansion preserves left ventricular geometry and function after acute anteroapical infarction*. *Circulation*, 1999. **99**(1): p. 135-42.
2. Zahn, R., et al., *Primary angioplasty versus intravenous thrombolysis in acute myocardial infarction: can we define subgroups of patients benefiting most from primary angioplasty? Results from the pooled data of the Maximal Individual Therapy in Acute Myocardial Infarction Registry and the Myocardial Infarction Registry*. *J Am Coll Cardiol*, 2001. **37**(7): p. 1827-35.
3. Braunwald, E. and R.A. Kloner, *Myocardial reperfusion: a double-edged sword?* *J Clin Invest*, 1985. **76**(5): p. 1713-9.
4. Hearse, D.J., *Reperfusion-induced injury: a possible role for oxidant stress and its manipulation*. *Cardiovasc Drugs Ther*, 1991. **5 Suppl 2**: p. 225-35.
5. Bolli, R. and E. Marban, *Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning*. *Physiol Rev*, 1999. **79**(2): p. 609-34.
6. Zweier, J.L., et al., *Measurement and characterization of postischemic free radical generation in the isolated perfused heart*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(32): p. 18890-5.
7. Garlick, P.B., et al., *Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy*. *Circ Res*, 1987. **61**(5): p. 757-60.
8. Massoudy, P., et al., *Reduction of oxygen delivery during post-ischemic reperfusion protects the isolated guinea pig heart*. *Basic Res Cardiol*, 1999. **94**(4): p. 231-7.
9. Blaustein, A.S., et al., *Influence of exogenously generated oxidant species on myocardial function*. *Am J Physiol*, 1986. **250**(4 Pt 2): p. H595-9.
10. Becker, B.F., et al., *Reactive oxygen species and nitric oxide in myocardial ischemia and reperfusion*. *Z Kardiol*, 2000. **89 Suppl 9**: p. IX/88-91.
11. Kaminski, K.A., et al., *Oxidative stress and neutrophil activation--the two keystones of ischemia/reperfusion injury*. *Int J Cardiol*, 2002. **86**(1): p. 41-59.
12. Becker, B.F., et al., *[Possible significance of free oxygen radicals for reperfusion injury]*. *Z Kardiol*, 1993. **82 Suppl 5**: p. 49-58.
13. Ambrosio, G., et al., *Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(25): p. 18532-41.
14. Duilio, C., et al., *Neutrophils are primary source of O₂ radicals during reperfusion after prolonged myocardial ischemia*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. **280**(6): p. H2649-57.
15. Bauersachs, J. and A. Schafer, *Tetrahydrobiopterin and eNOS dimer/monomer ratio--a clue to eNOS uncoupling in diabetes?* *Cardiovasc Res*, 2005. **65**(4): p. 768-9.
16. Förstermann, U., *Endothelial NO synthase as a source of NO and superoxide*. *European Journal of Clinical Pharmacology*. **62**: p. 5-12.
17. Ambrosio, G., et al., *Oxygen radicals generated at reflow induce peroxidation of membrane lipids in reperfused hearts*. *J Clin Invest*, 1991. **87**(6): p. 2056-66.

18. Paradies, G., et al., *Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(1-2): p. 42-50.
19. Wang, P., et al., *Overexpression of human copper, zinc-superoxide dismutase (SOD1) prevents postischemic injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4556-60.
20. Li, Q., et al., *Gene therapy with extracellular superoxide dismutase protects conscious rabbits against myocardial infarction*. Circulation, 2001. **103**(14): p. 1893-8.
21. Ceconi, C., et al., *New insights on myocardial pyridine nucleotides and thiol redox state in ischemia and reperfusion damage*. Cardiovasc Res, 2000. **47**(3): p. 586-94.
22. Matsunaga, T., et al., *Angiostatin inhibits coronary angiogenesis during impaired production of nitric oxide*. Circulation, 2002. **105**(18): p. 2185-91.
23. Neglia, D., et al., *Behavior of right and left ventricles during episodes of variant angina in relation to the site of coronary vasospasm*. Circulation, 1990. **81**(2): p. 567-77.
24. Yamasowa, H., et al., *Endothelial nitric oxide contributes to the renal protective effects of ischemic preconditioning*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **312**(1): p. 153-9.
25. Pagliaro, P., *Differential biological effects of products of nitric oxide (NO) synthase: it is not enough to say NO*. Life Sci, 2003. **73**(17): p. 2137-49.
26. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 3): p. 593-615.
27. Kojda, G., K. Kottenberg, and V. Thamer, *[Nitric oxide (NO). Its importance to heart function]*. Med Monatsschr Pharm, 1999. **22**(4): p. 114-23.
28. Jones, S.P., et al., *Myocardial ischemia-reperfusion injury is exacerbated in absence of endothelial cell nitric oxide synthase*. Am J Physiol, 1999. **276**(5 Pt 2): p. H1567-73.
29. Chandrasekar, B., J.T. Colston, and G.L. Freeman, *Induction of proinflammatory cytokine and antioxidant enzyme gene expression following brief myocardial ischaemia*. Clin Exp Immunol, 1997. **108**(2): p. 346-51.
30. Cain, B.S., A.H. Harken, and D.R. Meldrum, *Therapeutic strategies to reduce TNF-alpha mediated cardiac contractile depression following ischemia and reperfusion*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(5): p. 931-47.
31. Meldrum, D.R., et al., *Ischemic preconditioning decreases postischemic myocardial tumor necrosis factor-alpha production. Potential ultimate effector mechanism of preconditioning*. Circulation, 1998. **98**(19 Suppl): p. II214-8; discussion II218-9.
32. Massoudy, P., et al., *Sodium nitroprusside in patients with compromised left ventricular function undergoing coronary bypass: reduction of cardiac proinflammatory substances*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2000. **119**(3): p. 566-74.
33. Meldrum, D.R., et al., *Human myocardial tissue TNFalpha expression following acute global ischemia in vivo*. J Mol Cell Cardiol, 1998. **30**(9): p. 1683-9.
34. Meldrum, D.R., et al., *Increased myocardial tumor necrosis factor-alpha in a crystalloid-perfused model of cardiac ischemia-reperfusion injury*. Ann Thorac Surg, 1998. **65**(2): p. 439-43.
35. Frangogiannis, N.G., et al., *Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion*. Circulation, 1998. **98**(7): p. 699-710.

36. Entman, M.L., et al., *Is inflammation good for the ischemic heart--perspectives beyond the ordinary*. Z Kardiol, 2000. **89 Suppl 9**: p. IX/82-7.
37. Frantz, S., J. Bauersachs, and R.A. Kelly, *Innate immunity and the heart*. Curr Pharm Des, 2005. **11**(10): p. 1279-90.
38. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
39. Kurrelmeyer, K.M., et al., *Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5456-61.
40. Meldrum, D.R., *Tumor necrosis factor in the heart*. Am J Physiol, 1998. **274**(3 Pt 2): p. R577-95.
41. Sivasubramanian, N., et al., *Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor*. Circulation, 2001. **104**(7): p. 826-31.
42. Mallory, G., *The speed of healing of myocardial infarction: A study of the pathologic anatomy in seventy-two cases*. Am Heart J, 1939. **18**: p. 647-71.
43. Jolly, S.R., et al., *Reduction of myocardial infarct size by neutrophil depletion: effect of duration of occlusion*. Am Heart J, 1986. **112**(4): p. 682-90.
44. Litt, M.R., et al., *Neutrophil depletion limited to reperfusion reduces myocardial infarct size after 90 minutes of ischemia. Evidence for neutrophil-mediated reperfusion injury*. Circulation, 1989. **80**(6): p. 1816-27.
45. Harlan, J.M., et al., *Activated neutrophils disrupt endothelial monolayer integrity by an oxygen radical-independent mechanism*. Lab Invest, 1985. **52**(2): p. 141-50.
46. Vollmar, A. and T. Dingermann, *Immunologie Grundlagen und Wirkstoffe*. 2005: WVG.
47. Vinten-Johansen, J., *Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 481-97.
48. Pahl, H.L., *Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6853-66.
49. Sen, R. and D. Baltimore, *Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences*. Cell, 1986. **46**(5): p. 705-16.
50. Chandrasekar, B. and G.L. Freeman, *Induction of nuclear factor kappaB and activation protein 1 in postischemic myocardium*. FEBS Lett, 1997. **401**(1): p. 30-4.
51. Morgan, E.N., et al., *An essential role for NF-kappaB in the cardioadaptive response to ischemia*. Ann Thorac Surg, 1999. **68**(2): p. 377-82.
52. Beg, A.A., et al., *Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B*. Nature, 1995. **376**(6536): p. 167-70.
53. Sha, W.C., et al., *Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses*. Cell, 1995. **80**(2): p. 321-30.
54. Weih, F. and J. Caamano, *Regulation of secondary lymphoid organ development by the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway*. Immunol Rev, 2003. **195**: p. 91-105.
55. Mabley, J.G., et al., *NFkappaB1 (p50)-deficient mice are not susceptible to multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes*. J Endocrinol, 2002. **173**(3): p. 457-64.
56. Kanters, E., et al., *Hematopoietic NF-kappaB1 deficiency results in small atherosclerotic lesions with an inflammatory phenotype*. Blood, 2004. **103**(3): p. 934-40.

57. Schneider, A., et al., *NF-kappaB is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia*. Nat Med, 1999. **5**(5): p. 554-9.
58. Ertl, G. and S. Frantz, *Wound model of myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(3): p. H981-3.
59. Pfeffer, M.A. and E. Braunwald, *Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications*. Circulation, 1990. **81**(4): p. 1161-72.
60. Ross, J., Jr., *Left ventricular function after coronary artery reperfusion*. Am J Cardiol, 1993. **72**(19): p. 91G-97G.
61. Swynghedauw, B., *Molecular mechanisms of myocardial remodeling*. Physiol Rev, 1999. **79**(1): p. 215-62.
62. Ertl, G. and S. Frantz, *Healing after myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2005. **66**(1): p. 22-32.
63. Weisman, H.F., et al., *Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion*. Circulation, 1988. **78**(1): p. 186-201.
64. Blankesteyn, W.M., et al., *Dynamics of cardiac wound healing following myocardial infarction: observations in genetically altered mice*. Acta Physiol Scand, 2001. **173**(1): p. 75-82.
65. Nian, M., et al., *Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling*. Circ Res, 2004. **94**(12): p. 1543-53.
66. Sun, M., et al., *Excessive tumor necrosis factor activation after infarction contributes to susceptibility of myocardial rupture and left ventricular dysfunction*. Circulation, 2004. **110**(20): p. 3221-8.
67. Yang, C.H., et al., *IFNalpha/beta promotes cell survival by activating NF-kappa B*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13631-6.
68. Frangogiannis, N.G., C.W. Smith, and M.L. Entman, *The inflammatory response in myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(1): p. 31-47.
69. Whittaker, P., D.R. Boughner, and R.A. Kloner, *Role of collagen in acute myocardial infarct expansion*. Circulation, 1991. **84**(5): p. 2123-34.
70. Lindsey, M.L., et al., *Extracellular matrix remodeling following myocardial injury*. Ann Med, 2003. **35**(5): p. 316-26.
71. Michael, L.H., et al., *Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model*. Am J Physiol, 1995. **269**(6 Pt 2): p. H2147-54.
72. Junqueira, L.C., G. Bignolas, and R.R. Brentani, *Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections*. Histochem J, 1979. **11**(4): p. 447-55.
73. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
74. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
75. Wong, S.H., et al., *Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct*. Clin Chem, 1987. **33**(2 Pt 1): p. 214-20.
76. Shesely, E.G., et al., *Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(23): p. 13176-81.
77. Frantz, S., et al., *Tissue-Specific Effects of the Nuclear Factor {kappa}B Subunit p50 on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury*. Am J Pathol, 2007.

78. Adamek, A., et al., *High dose aspirin and left ventricular remodeling after myocardial infarction : Aspirin and myocardial infarction*. Basic Res Cardiol, 2007.
79. Nakanishi, K., et al., *Intracoronary L-arginine during reperfusion improves endothelial function and reduces infarct size*. Am J Physiol, 1992. **263**(6 Pt 2): p. H1650-8.
80. Weyrich, A.S., X.L. Ma, and A.M. Lefer, *The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat*. Circulation, 1992. **86**(1): p. 279-88.
81. Duranski, M.R., et al., *Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver*. J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1232-40.
82. Mombouli, J.V. and P.M. Vanhoutte, *Endothelial dysfunction: from physiology to therapy*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(1): p. 61-74.
83. Rajagopalan, S., et al., *Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone*. J Clin Invest, 1996. **97**(8): p. 1916-23.
84. Yang, J., et al., *Pranidipine enhances the action of nitric oxide released from endothelial cells*. Hypertension, 2000. **35**(1 Pt 1): p. 82-5.
85. Laufs, U. and J.K. Liao, *Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors*. Trends Cardiovasc Med, 2000. **10**(4): p. 143-8.
86. Ockaili, R., et al., *Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial K(ATP) channels in rabbits*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(3): p. H1263-9.
87. Jones, S.P., et al., *Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates myocardial reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(1): p. H276-82.
88. Sharp, B.R., et al., *Differential response to myocardial reperfusion injury in eNOS-deficient mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(6): p. H2422-6.
89. Yang, X.P., et al., *Endothelial nitric oxide gene knockout mice: cardiac phenotypes and the effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor on myocardial ischemia/reperfusion injury*. Hypertension, 1999. **34**(1): p. 24-30.
90. Abou-Mohamed, G., et al., *Roles of superoxide, peroxynitrite, and protein kinase C in the development of tolerance to nitroglycerin*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **308**(1): p. 289-99.
91. Slack, C.J., et al., *Biotransformation of glyceryl trinitrate and isosorbide dinitrate in vascular smooth muscle made tolerant to organic nitrates*. Can J Physiol Pharmacol, 1989. **67**(11): p. 1381-5.
92. Becker, L.B., *New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 461-70.
93. Jones, S.P. and R. Bolli, *The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection*. J Mol Cell Cardiol, 2006. **40**(1): p. 16-23.
94. Eiserich, J.P., et al., *Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification*. J Biol Chem, 1996. **271**(32): p. 19199-208.
95. Eiserich, J.P., et al., *Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils*. Nature, 1998. **391**(6665): p. 393-7.
96. Brown, G.C. and V. Borutaite, *Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart*. Cardiovasc Res, 2007.

97. Baeuerle, P.A. and T. Henkel, *Function and activation of NF-kappa B in the immune system*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 141-79.
98. Ritchie, M.E., *Nuclear factor-kappaB is selectively and markedly activated in humans with unstable angina pectoris*. Circulation, 1998. **98**(17): p. 1707-13.
99. Frantz, S., et al., *Absence of NF-kappaB subunit p50 improves heart failure after myocardial infarction*. Faseb J, 2006. **20**(11): p. 1918-20.
100. Morishita, R., et al., *In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction*. Nat Med, 1997. **3**(8): p. 894-9.
101. Onai, Y., et al., *Inhibition of IkappaB phosphorylation in cardiomyocytes attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2004. **63**(1): p. 51-9.
102. Tanaka, M., et al., *Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF-kappa B activation in IKK-beta-deficient mice*. Immunity, 1999. **10**(4): p. 421-9.
103. Shekher, A. and M. Singh, *Role of eicosanoid inhibition of ischemia reperfusion injury: intact and isolated rat heart studies*. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 1997. **19**(4): p. 223-9.
104. Squadrito, F., et al., *Gene transfer of IkappaBalpha limits infarct size in a mouse model of myocardial ischemia-reperfusion injury*. Lab Invest, 2003. **83**(8): p. 1097-104.
105. Kawamura, N., et al., *Blockade of NF-kappaB improves cardiac function and survival without affecting inflammation in TNF-alpha-induced cardiomyopathy*. Cardiovasc Res, 2005. **66**(3): p. 520-9.
106. Kawano, S., et al., *Blockade of NF-kappaB ameliorates myocardial hypertrophy in response to chronic infusion of angiotensin II*. Cardiovasc Res, 2005. **67**(4): p. 689-98.
107. Lawrence, T., et al., *Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation*. Nat Med, 2001. **7**(12): p. 1291-7.
108. Chandrasekar, B., J.B. Smith, and G.L. Freeman, *Ischemia-reperfusion of rat myocardium activates nuclear factor-KappaB and induces neutrophil infiltration via lipopolysaccharide-induced CXC chemokine*. Circulation, 2001. **103**(18): p. 2296-302.
109. Hilliard, B., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis in NF-kappa B-deficient mice: roles of NF-kappa B in the activation and differentiation of autoreactive T cells*. J Immunol, 1999. **163**(5): p. 2937-43.
110. Yang, Z., et al., *Myocardial infarct-sparing effect of adenosine A2A receptor activation is due to its action on CD4+ T lymphocytes*. Circulation, 2006. **114**(19): p. 2056-64.
111. Jousen, A.M., et al., *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs prevent early diabetic retinopathy via TNF-alpha suppression*. Faseb J, 2002. **16**(3): p. 438-40.
112. Solheim, S., et al., *Influence of aspirin on inflammatory markers in patients after acute myocardial infarction*. Am J Cardiol, 2003. **92**(7): p. 843-5.
113. Frantz, S., et al., *Sustained activation of nuclear factor kappa B and activator protein 1 in chronic heart failure*. Cardiovasc Res, 2003. **57**(3): p. 749-56.
114. Ono, K., et al., *Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling*. Circulation, 1998. **98**(2): p. 149-56.
115. Schoemaker, R.G., P.R. Saxena, and E.A. Kalkman, *Low-dose aspirin improves in vivo hemodynamics in conscious, chronically infarcted rats*. Cardiovasc Res, 1998. **37**(1): p. 108-14.

116. Van Kerckhoven, R., et al., *Altered cardiac collagen and associated changes in diastolic function of infarcted rat hearts*. Cardiovasc Res, 2000. **46**(2): p. 316-23.
117. Kalkman, E.A., et al., *Chronic aspirin treatment affects collagen deposition in non-infarcted myocardium during remodeling after coronary artery ligation in the rat*. J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(11): p. 2483-94.
118. Jancso, G., et al., *Effect of acetylsalicylic acid on nuclear factor-kappaB activation and on late preconditioning against infarction in the myocardium*. J Cardiovasc Pharmacol, 2005. **46**(3): p. 295-301.
119. Feenstra, J., et al., *Association of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with first occurrence of heart failure and with relapsing heart failure: the Rotterdam Study*. Arch Intern Med, 2002. **162**(3): p. 265-70.
120. Muller, D.N., et al., *Aspirin inhibits NF-kappaB and protects from angiotensin II-induced organ damage*. Faseb J, 2001. **15**(10): p. 1822-4.
121. Bryant, D., et al., *Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor-alpha*. Circulation, 1998. **97**(14): p. 1375-81.
122. Kubota, T., et al., *Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha*. Circ Res, 1997. **81**(4): p. 627-35.
123. Bozkurt, B., et al., *Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor-alpha promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats*. Circulation, 1998. **97**(14): p. 1382-91.
124. Roberts, R., V. DeMello, and B.E. Sobel, *Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction*. Circulation, 1976. **53**(3 Suppl): p. I204-6.
125. Anversa, P. and B. Nadal-Ginard, *Myocyte renewal and ventricular remodeling*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 240-3.
126. Saito, T., et al., *Inhibition of COX pathway in experimental myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **37**(1): p. 71-7.

12. Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Anna Adamek
geboren in Loslau (Polen) 19.06.1976
ledig

Schulbildung

Edith- Stein- Schule in Darmstadt 08.1988 – 06.1997
Abschluss: Abitur

Hochschulbildung

Studium der Pharmazie 04.1998 – 10.2002
an der Johannes Gutenberg
Universität Mainz

- | | |
|-----------------|------------|
| 1. Staatsexamen | 11.04.2001 |
| 2. Staatsexamen | 23.10.2002 |
| 3. Staatsexamen | 27.11.2003 |

Promotion

Wissenschaftliche Mitarbeiterin 01.2004 – 12.2006
am Universitätsklinikum in Würzburg
innerhalb der kardiologischen Forschung

Berufliche Tätigkeit

Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der analytischen Entwicklung
bei Hexal AG in Holzkirchen seit Februar 2007

Famulaturen

Alpha Apotheke in Darmstadt 08.1998
Merck in Darmstadt; Einsatz innerhalb
der Pharmaproduktion 03.1999

Praktisches Jahr

Engel Apotheke in Darmstadt 11.2002 - 04.2003
Merck in Darmstadt, Einsatz innerhalb
der Pharmaproduktion 05.2003 - 10.2003

Praktika

Alpha Apotheke in Darmstadt 10.1997 - 02.1998
IPSF Internationaler Studentenaustausch
in Regina, Kanada 09.1999

Nebenbeschäftigung

Apothekerin in der Westend-Apotheke
in Schweinfurt 04.2004 – 04.2007

13. Erklärungen

Erklärungen gemäß § 4 Absatz 3 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg vom 15. März 1999

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Des Weiteren habe ich früher keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben gesucht.

Würzburg, 10. Oktober 2008

Anna Katharina Adamek