

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

**Linksventrikuläre Dysfunktion und Remodeling nach
Myokardinfarkt bei Ratten:
Einfluss des eNOS-Transkriptions-Verstärkers AVE9488**

Inaugural - Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät**

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Michael Hoffmann

aus Würzburg

Würzburg, September 2006

Referent: Priv.-Doz. Dr. Johann Bauersachs

Koreferent: Prof. Dr. Stefan Engelhardt

Dekan: Prof. Dr. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 31.05.2007

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	
1. EINLEITUNG	1
2. METHODEN	12
2.1 Studienprotokoll	12
2.2 Durchführung des experimentellen Myokardinfarkts.....	13
2.3 Hämodynamische Messungen	14
2.3.1 Prinzip des Conductance-Katheters	14
2.3.2 Versuchsdurchführung	16
2.4 Bestimmung der Infarktgröße.....	18
2.5 Messung der linksventrikulären Genexpression.....	19
2.5.1 RNA-Isolierung.....	19
2.5.2 Durchführung der cDNA-Synthese.....	21
2.5.3 Plasmid-Klonierung als Standard für die Real Time PCR.....	21
2.5.4 Real Time PCR	23
2.6 Proteinanalyse.....	25
2.6.1 Proteinextraktion	25
2.6.2 Western Blot.....	26
2.7 Messung der linksventrikulären Kollagenmenge	27
2.8 Bestimmung der NOS-Aktivität	28
2.9 Statistische Auswertung	30
3. ERGEBNISSE	31
3.1 Infarktgröße, Ventrikelmorphologie und Hämodynamik.....	31
3.2 Expression und Aktivität der eNOS	36
3.3 Linksventrikuläre Genexpression	40
3.4 Linksventrikuläre Fibrosierung	42
4. DISKUSSION	44
4.1 Tiermodell der Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt.....	44
4.2 Hämodynamik	45
4.3 Expression und Aktivität der eNOS	47
4.4 Ventrikuläre Morphologie und Hypertrophie	50
4.5 Linksventrikuläre Fibrosierung	52
5. ZUSAMMENFASSUNG	54
6. LITERATURVERZEICHNIS	56
LEBENS LAUF	
DANKSAGUNG	

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Konversions-Enzym
ANP	atrial natriuretic peptide
BNP	brain natriuretic peptide
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
dp/dt_{\max}	maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit
dp/dt_{\min}	maximale Druckabfallgeschwindigkeit
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid
FMN	Flavin-mononucleotid
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
iNOS	induzierbare NO-Synthase
LV	linker Ventrikel
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVEDV	linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
LVESV	linksventrikuläres endsystolisches Volumen
LVSP	linksventrikulärer systolischer Druck
MHC	schwere Kette des Myosins
mRNA	Botenstoff-Ribonukleinsäure
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduzierte Form)
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NYHA	New York Heart Association
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RV	rechter Ventrikel
sGC	lösliche Guanylatcyclase
TGF- β	Tumorstromafaktor- β
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α

1. Einleitung

In den letzten Jahrzehnten ergaben sich große Veränderungen im Hinblick auf das Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen, die bei der Entstehung und Progredienz der chronischen Herzinsuffizienz von Bedeutung sind. Gleiches gilt auch für die bei diesem Syndrom angewandten therapeutischen Strategien, die ebenfalls einen ausgeprägten Wandel erfuhren (1). Für verschiedene Medikamentengruppen konnte eine signifikante Reduktion von Mortalität und Krankenhausaufenthalten sowie eine Verbesserung der Lebensqualität nachgewiesen werden (2-5). Trotz dieser Entwicklung bleiben Inzidenz und Mortalität der Herzinsuffizienz enorm hoch: Bei jenen Patienten, bei denen in den 90er-Jahren die Diagnose Herzinsuffizienz gestellt wurde, lag die 5-Jahres-Überlebensrate unter 50 Prozent (6). Aktuelle Schätzungen gehen von 1-Jahres-Mortalitäten für die NYHA-Klassen II, III und IV von 10%, 20% bzw. 40% aus (7). Damit ist die Prognose v. a. der fortgeschrittenen Herzinsuffizienz schlechter als die vieler maligner Erkrankungen, auch die Lebensqualität unterliegt starken Einschränkungen (8). In Anbetracht der immer älter werdenden Bevölkerung und der verbesserten Überlebenschancen nach einem Herzinfarkt wird die Prävalenz der Herzinsuffizienz voraussichtlich weiter ansteigen. Dies stellt ein zunehmendes Problem auch für die Gesundheitssysteme der westlichen Industrieländer dar (9), die bis zu 2% ihrer jährlichen Ausgaben im Gesundheitswesen für Patienten mit Herzinsuffizienz aufwenden (10). Es bleibt also eine dringende Herausforderung für Forscher und Kliniker, nach neuen therapeutischen Wegen für die Behandlung dieses Syndroms zu suchen.

Neben der arteriellen Hypertonie ist es vor allem die koronare Herzkrankheit, in deren Folge eine chronische Herzinsuffizienz entsteht (7). Ehemals als simples Pumpversagen verstanden, fasst man sie heute als ein komplexes klinisches Syndrom auf, das unter anderem durch neurohumorale Aktivierung und ventrikuläres Remodeling gekennzeichnet ist (1). Die genauen Vorgänge, die am ischämischen Herz zur fortschreitenden Funktionsstörung führen, sind Gegenstand intensiver Forschung. In den ersten Stunden nach einem Myokardinfarkt kommt es zur Myozytennekrose und einer Entzündungsreaktion mit Ödembildung in der Infarktregion, gefolgt von einer Wochen bis Monate andauernden Phase der Re-Organisation des nekrotischen Gebietes mit Fibroblastenproliferation

und Kollagenbildung, d. h. es kommt zur Entstehung einer Infarktnarbe (11). Während der Resorption des nekrotischen Gewebes kann u. a. die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen zur sog. Infarktexpansion führen, d. h. zu einer Ausdehnung der Infarktregion mit Ausdünnung der Ventrikelwand in diesem Bereich (12). Durch den Verlust an funktionsfähigem kontraktilem Gewebe steigt die Belastung des gesunden Restmyokards, das dadurch einer erhöhten Wandspannung ausgesetzt ist. Im weiteren Verlauf können kompensatorische Myozytenhypertrophie, reaktive Fibrose und chronische Herzinsuffizienz als Folgen des Myokardinfarkts entstehen. Letztlich kommt es also zu Umbauprozessen sowohl in der Infarktregion als auch im vitalen Restmyokard, die zu Veränderungen von Ventrikelgröße, -form und -funktion führen und in ihrer Gesamtheit als ventrikuläres Remodeling bezeichnet werden (13,14). Ausgangspunkt der ischämischen Kardiomyopathie ist somit der Myozytenverlust infolge eines Infarkts oder einer sehr ausgedehnten Minderperfusion, die fortschreitende Verschlechterung und mögliche Dekompensation der Erkrankung hingegen geht vorwiegend auf Prozesse zurück, die sich im nichtinfarzierten Myokard abspielen (15).

Verschiedene adaptive Prozesse dienen der Aufrechterhaltung einer stabilen hämodynamischen Situation, v. a. die Aktivierung neurohumoraler Systeme (13). Neben der sympathoadrenergen Aktivierung ist hier besonders das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System zu nennen, von Bedeutung ist aber auch die erhöhte Ausschüttung von Endothelin und Vasopressin sowie einiger Zytokine (14). Noradrenalin hat positiv inotrope Effekte und erhöht durch eine Steigerung des Gefäßtonus das venöse Angebot an das Herz, das durch den Frank-Starling-Mechanismus auf die größere Vorlast mit einem erhöhten Schlagvolumen reagieren kann. Angiotensin II wirkt vasokonstriktorisch und ermöglicht damit die Aufrechterhaltung eines ausreichenden arteriellen Mitteldrucks (16). Während diese Kompensationsmechanismen kurzfristig also einen wichtigen Anpassungsprozess zur Aufrechterhaltung der Herz-Kreislauf-Funktion darstellen, führt die anhaltende Aktivierung dieser Systeme im weiteren Verlauf zu einer fortschreitenden Verschlechterung der chronischen Herzinsuffizienz, indem sie deletäre Mechanismen im überlebenden Myokard in Gang setzt (14,16). Hierzu zählen eine Erhöhung der Vor- und Nachlast ebenso wie verschiedene direkte Effekte am Herzen (17).

Durch den Ausfall von kontraktilen Gewebe kommt es neben der erwähnten Aktivierung neurohumoraler Systeme und anderer Signalmoleküle (Zytokine, lokale para- und autokrine Faktoren) auch zu mechanischen Veränderungen und letztlich zur weiteren Beeinträchtigung der Funktion im Sinne eines Circulus Vitiosus (14). Ein wichtiger Anpassungsprozess im Rahmen des ventrikulären Remodelings ist die Hypertrophie der Myokardzellen, die den Veränderungen infolge des Verlusts kontraktiler Elemente entgegenwirkt. Sie gleicht die erhöhte Belastung des überlebenden Myokards aus, steuert der fortschreitenden Dilatation entgegen und stabilisiert somit die linksventrikuläre Funktion (11). Ein bedeutender Stimulus für die Hypertrophie ist die erhöhte Wandspannung: Kardiomyozyten registrieren mechanische Dehnung und transformieren sie in intrazelluläre Signalwege, die den Hypertrophieprozess herbeiführen (18). Diese Signalwege bestehen in einer vielfältigen Veränderung der Genexpression ebenso wie in einer Aktivierung zahlreicher Second-Messenger-Systeme. Welche Mediatoren für die Mechanosensitivität der Herzmuskelzellen verantwortlich sind, ist in weiten Teilen noch unklar, diskutiert werden durch Dehnung aktivierbare Ionenkanäle und Integrine (19).

Die veränderte Genexpression besteht in der Aktivierung sog. „Immediate Early“-Gene, deren Rolle im Hypertrophieprozess ungeklärt ist, und besonders in der Induktion fetaler Genprogramme, beispielsweise Atrial Natriuretic Peptide (ANP), Brain Natriuretic Peptide (BNP), β -Myosin Heavy Chain (β -MHC) sowie skelettales α -Actin (13,14). Hierdurch entstehende Veränderungen in der Genexpression betreffen Proteine, die für den Kontraktionsprozess oder den Calcium-Transport von Bedeutung sind, was entsprechende Funktionsstörungen zur Folge hat. Bei der Hypertrophie der Myozyten liegt somit nicht nur eine quantitative Erhöhung wichtiger Proteine vor, die kontraktile Funktion wird vielmehr auch durch eine qualitative Modifizierung bedeutsamer Bausteine gestört (1,14). Auch wenn viele der Signalkaskaden, die im Hypertrophieprozess eine Rolle spielen, mittlerweile beschrieben sind, so bleibt doch weitgehend unbekannt, welche Mediatoren durch mechanische Faktoren induziert bzw. welche erst indirekt durch andere Moleküle aktiviert werden (18). Zu den neurohumoralen und para- bzw. autokrinen bedeutsamen Mediatoren der Hypertrophieentstehung sind besonders Angiotensin II, Noradrenalin, Endothelin-1, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β zu zäh-

len (14). Resultat der beschriebenen Mechanismen sind letztlich strukturelle Veränderungen der Myozyten in Form einer Verlängerung bzw. Vergrößerung (15). Zwei Formen der Hypertrophie werden unterschieden: Eine erhöhte Druckbelastung des Herzens führt typischerweise zur konzentrischen Hypertrophie, die durch eine Wandverdickung ohne Zunahme des Ventrikelvolumens charakterisiert ist. Bei der exzentrischen Hypertrophie hingegen kommt es infolge einer Volumenbelastung neben der Größen- und Massenzunahme der Kardiomyozyten auch zu einer Dilatation des Ventrikels (15,19). Diese beruht zum einen auf einem Auseinanderdriften der Kardiomyozyten („myocardial slippage“), zum anderen wird im überlebenden Myokard eine über das laterale Wachstum hinausgehende Zellverlängerung beschrieben, d. h. die anatomischen Veränderungen resultieren in einer deutlichen Verringerung des Verhältnisses von Wanddicke zu Ventrikelvolumen (14,15,19). Charakteristisch für die Herzinsuffizienz ischämischen Ursprungs ist also die dekompenzierte exzentrische Hypertrophie (15). Das dilatierte, hypertrophierte Herz hat aufgrund der beschriebenen Veränderungen eine verschlechterte Energiebilanz sowie eine veränderte Proteinzusammensetzung u. a. des Zytoskeletts, des sarkoplasmatischen Retikulums, myofibrillärer Proteine und des Sarkomers, was einerseits zu kardialen Funktionsstörungen führt und andererseits eine weitere Progression des Remodelings begünstigt (14,19).

Charakteristisch für das insuffiziente und hypertrophierte Herz sind darüber hinaus Veränderungen der extrazellulären Matrix (14). Die chronische Herzinsuffizienz ischämischen Ursprungs ist gekennzeichnet durch fibrotische Veränderungen nicht nur im Bereich des abgelaufenen Infarktes, sondern auch im davon entfernten Gewebe (15,20, 21). Kollagenvermehrung und Fibrosierung finden sich im erhaltenen Restmyokard sowohl an Stellen untergegangener Myozyten als auch diffus verteilt in erweiterten interstitiellen Räumen (15). Diese Akkumulation von extrazellulärer Matrix auch im überlebenden Myokard außerhalb des eigentlichen Infarktgebiets führt zu einer Versteifung des Ventrikels mit Behinderung der Kontraktionsfähigkeit und Störung der Relaxation (14,20). Sie stellt damit einen wesentlichen Pathomechanismus im Prozess des ventrikulären Remodelings dar (15,20). Ähnliche Veränderungen bzgl. der Kollagenmenge beobachtet man zudem in Herzen, deren Hypertrophie Folge einer Hypertonie ist (21). Eine zentrale Rolle kommt auch bei diesen Veränderungen der extrazellulären Matrix

wiederum der neurohumoralen Aktivierung zu. Dies gilt insbesondere für das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (22). Im Myokard außerhalb des Infarktbereichs wurden signifikante Erhöhungen der Angiotensin II- bzw. der Aldosteron-Konzentration gemessen, was mit einer entsprechend verstärkten Fibrosierung einherging. Diese konnte durch den Aldosteron-Antagonisten Spironolacton und den Angiotensin-Rezeptor-Blocker Losartan jedoch deutlich reduziert werden konnte (23,24). Besonders bedeutsam ist offenbar eine verstärkte lokale Produktion von Angiotensin II und Aldosteron (20,23,24). Diese Erkenntnisse werden durch zahlreiche Arbeiten gestützt, die eine reduzierte Kollagenvermehrung im Herzen durch Antagonisierung dieser Mediatoren beobachten (25-29). Auch in Untersuchungen an kultivierten kardialen Fibroblasten wurde gezeigt, dass Angiotensin II und Aldosteron die Kollagensynthese stimulieren (22). Darüber hinaus sind noch eine Reihe weiterer Faktoren am Remodeling der extrazellulären Matrix beteiligt, u. a. Endothelin, Tumorstromungsfaktor- β 1 (TGF- β 1) und TNF- α (30). Letztlich führen Kollagenvermehrung und Fibrosierung zu systolischer und diastolischer Dysfunktion, außerdem werden sie mit dem plötzlichen Herztod durch ventrikuläre Rhythmusstörungen in Verbindung gebracht (23,28). Nochmals unterstrichen wird die Bedeutung dieser Prozesse im kardialen Remodeling durch die Beobachtung, dass Markern für den Kollagenumsatz auch prognostische Relevanz zukommt (28).

Neben den genannten Veränderungen wie Myozytenhypertrophie, Fibrosierung, Ventrikeldilatation, neurohumorale Aktivierung oder veränderte Genexpression spielen noch eine Reihe weitere Prozesse in der Pathophysiologie des kardialen Remodelings eine wichtige Rolle. Zu nennen ist die zunehmend ineffiziente Energieausbeute des erkrankten Herzens, was sich auch in der prognostischen Bedeutung einer Reduzierung von Kreatinphosphat widerspiegelt (31-34). Ebenso gilt eine veränderte Expression von β -Rezeptoren, d. h. insbesondere eine Downregulation und ein Funktionsverlust der Rezeptoren durch Phosphorylierung, als gesichert (35,36). Diskutiert werden ferner Veränderungen im Zytoskelett der Myozyten (37-39) und eine vermehrte Apoptose von Herzmuskelzellen (40,41). Insgesamt handelt es sich also um einen äußerst komplexen Prozess, der hinsichtlich zahlreicher Aspekte noch unvollständig geklärt ist.

Zunehmend in den Blickpunkt zahlreicher Arbeiten geriet in den letzten Jahren die Rolle von Stickstoffmonoxid (NO) und der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) (42,43). Während die physiologische und pathophysiologische Bedeutung des NO-Systems zunehmend besser verstanden werden, gibt es bisher kaum therapeutische Ansätze, die sich diese Erkenntnisse zunutze machen können. Nachdem im Jahre 1980 erstmals über den sog. Endothelium-derived relaxing factor (EDRF) berichtet wurde (44), identifizierten einige Jahre später mehrere Arbeitsgruppen unabhängig voneinander diesen als NO (45-47). Wenig später folgte dann die Beschreibung der NO-Synthasen (NOS) als jene Enzyme, die die Reaktion zur Bildung dieses winzigen Moleküls katalysieren (42,43,48-50), sowie deren erstmalige Aufreinigung und Klonierung (51-55). Man unterscheidet derzeit drei Isoenzyme der NO-Synthasen: Die neuronale (nNOS oder NOS-1), die induzierbare (iNOS oder NOS-2) und die endotheliale Form (eNOS oder NOS-3), die u. a. im Hinblick auf Struktur, Vorkommen, Funktion und Regulation verschiedene Eigenschaften aufweisen (42,43). Die Einteilung in nNOS und eNOS als konstitutiv exprimierte Enzyme einerseits und iNOS als induzierbares Enzym andererseits musste relativiert werden: In Abhängigkeit von der physiologischen Situation und dem jeweiligen Gewebe sind für alle drei NO-Synthasen konstitutive und induzierbare Expressionsmuster beschrieben (42,56,57).

Alle drei Isoformen der NOS beeinflussen das kardiovaskuläre System, wobei der eNOS hierbei vermutlich die größte Bedeutung zukommt (57,58). Alle drei liegen in ihrer aktiven Form als Homodimere vor. Die Synthese von NO und Citrullin aus L-Arginin und O₂ erfordert die Bindung von Calmodulin und eine Reihe von Kofaktoren, nämlich die reduzierte Form des Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH), Flavin-mononucleotid (FMN), Flavin-adenin-dinucleotid (FAD), Tetrahydrobiopterin und eine prosthetische Hämgruppe (42,43,57-60). Der Aufbau und die Funktionsweise der NOS werden in Abb. 1 veranschaulicht (siehe nächste Seite):

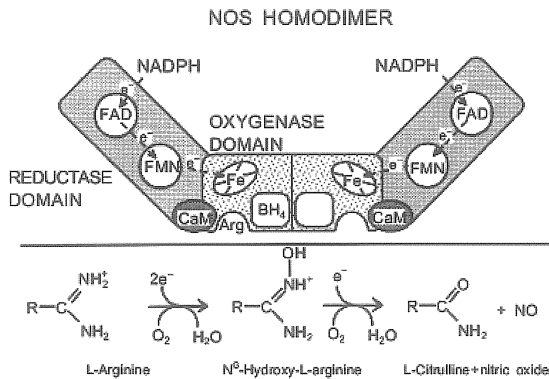


Abb. 1: NOS-Homodimer mit Calmodulin (CaM), Kofaktoren und Substraten: Die Grundstruktur mit Reduktase- und Oxygenase-Domäne und der abgebildete Weg der Elektronen durch das Enzym sind Gemeinsamkeiten aller drei NOS-Isoformen (aus (60)).

Die NO-Synthasen kommen in nahezu allen Geweben vor, u. a. in Neuronen, Makrophagen, Hepatozyten, Fibroblasten und glatten Muskelzellen, aber auch in Endothelzellen und Kardiomyozyten (56). Entsprechend seiner ursprünglichen Beschreibung als EDRF im Gefäßendothel wirkt NO vasodilatatorisch, antithrombotisch und antiatherogen (61,62). Neben diesen indirekten Wirkungen reguliert NO die kardiale Funktion auch auf direkte Weise: Alle drei Isoformen der NOS sind in Kardiomyozyten exprimiert - eine Entdeckung, die zahlreiche Fragen aufgeworfen hat (58,61,63). In diesem Zusammenhang wurden in den letzten Jahren zunehmend genauere Kenntnisse über das fein regulierte Zusammenspiel der verschiedenen Isoenzyme gewonnen, wobei deren unterschiedlicher Lokalisation und Regulation besondere Bedeutung zuzukommen scheint (57,58,61,64,65). Dies gilt umso mehr, da man gegensätzliche Wirkungen von NO beobachtet, beispielsweise zytotoxische oder zytoprotektive Wirkungen sowie Erhöhung oder Verminderung der kardialen Kontraktilität (56, 64).

Einen grundlegenden Regulationsmechanismus stellt insbesondere die gewebsspezifische Verteilung der NOS-Isoformen dar: Im kardiovaskulären System ist die eNOS die wichtigste NO-Quelle (57,58). Darüber hinaus beschrieben Barouch et al. 2002 die Bedeutung der unterschiedlichen intrazellulären Lokalisation von eNOS und nNOS für die Regulation der kardialen Kontraktilität (65). Die doppelte Acylierung der eNOS mit einem Myristoyl- und einem Palmitoyl-Rest dient deren Lokalisation in den plasmalemmalen Caveolae, die als Invaginationen der Zellmembran eine wichtige Funktion im Rahmen intrazellulärer Signalwege besitzen (42,58,61,66,67). Als Hüllproteine der Caveolae wurden die Caveoline identifiziert; die Bindung der eNOS an Caveolin-1 (in Endothelzellen) bzw. Caveolin-3 (in Myozyten) ist funktionell relevant. Hierdurch wird die basale Aktivität der eNOS inhibiert, was durch die Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin aufgehoben werden kann (42,58,68). Neben dieser inhibitorischen Wirkung kann die Interaktion mit Caveolin andererseits auch die NO-Produktion der eNOS fördern und wieder beenden - scheinbar widersprüchliche Vorgänge, die auch als „caveolar paradox“ bezeichnet wurden (Feron et al., 67) und ein besonderes Beispiel für die Komplexität der eNOS-Regulation darstellen. Die nNOS hingegen steht in keiner Verbindung zu den Caveolinen, wurde vorwiegend im sarkoplasmatischen Retikulum gefunden und ist mit dem Ryanodin-Rezeptor assoziiert (57,58,64,65). Die iNOS wird vorwiegend im Zytosol induziert und ist offenbar weniger einem bestimmten Kompartiment zuzuordnen (58,64).

Neben der unterschiedlichen Lokalisation der NOS-Isoformen wird die NO-Bildung auf weiteren Ebenen reguliert. Bereits angedeutet wurde die Rolle von Calmodulin, das für die enzymatische Aktivität aller drei NO-Synthasen benötigt wird. Während eine Bindung dieses Proteins an die iNOS auch bei sehr niedrigen Calcium-Spiegeln möglich ist, können die eNOS und nNOS von Calmodulin nur in Anwesenheit von Calcium aktiviert werden, weshalb Signalwege, die zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führen, auf diese Weise ebenfalls an der Regulation der NO-Bildung beteiligt sind (42,57).

Eine Ca^{2+} /Calmodulin-unabhängige Aktivierung der eNOS ist durch Phosphorylierung verschiedener Serin- oder Threonin-Reste möglich; auch die beiden anderen NOS-Isomere unterliegen einer Regulation durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung (42, 57,58). Seit einigen Jahren bekannt ist die Phosphorylierung der eNOS am Serinrest Ser¹¹⁷⁷ (bzw. Ser¹¹⁷⁹ beim Rind) durch einen Proteinkinase Akt (auch bekannt als Proteinkinase B) -abhängigen Mechanismus (69,70). Die Proteinkinase Akt unterliegt der Kontrolle der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). Über diesen Weg bewirkt beispielsweise eine erhöhte Schubspannung eine verstärkte NO-Bildung. Dies gilt auch für eine Reihe weiterer Faktoren und Mediatoren: Hierzu zählen akute Hypoxie, Insulin, Östrogene oder Bradykinin, aber auch Medikamente wie Statine (57,58). Ebenso ist eine Phosphorylierung am Ser¹¹⁷⁷ über andere Proteinkinasen möglich (58,71). Dagegen bewirken bestimmte Stimuli eine Dephosphorylierung und damit Inaktivierung: Beispiele hierfür sind chronische Hypoxie oder Hyperglykämie (58). In den letzten Jahren wurden darüber hinaus ähnliche Mechanismen am Ser⁶¹⁷ und Ser⁶³⁵ bzw. am Ser¹¹⁶ und Thr⁴⁹⁵ beschrieben, wobei eine Phosphorylierung der beiden letztgenannten Enzyme die Aktivität der eNOS inhibiert (57,58,72-74).

Unter bestimmten Umständen sind auch reaktive Sauerstoffmetaboliten wie Superoxid oder Peroxynitrit als Reaktionsprodukte eNOS-katalysierter Reaktionen möglich (75, 76). Dieses Phänomen wird als "eNOS-Entkopplung" bezeichnet. Die eNOS liegt dann offenbar als Monomer vor (76). Verschiedene Arbeiten belegen die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies in der Pathogenese von linksventrikulärer Dysfunktion und pathologischem Remodeling (77-79). In Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies generiert die eNOS selbst Sauerstoffradikale und wird dadurch zu einer zusätzlichen Radikalquelle, was eine Verstärkung des oxidativen Stresses zur Folge hat (76,80). Im Tiermodell konnte zudem gezeigt werden, dass auch eine chronische Druckbelastung zur eNOS-Entkopplung führen kann (76). Ein Mangel an Substrat (L-Arginin) oder Kofaktoren (Tetrahydrobiopterin) begünstigt vermutlich die Entkopplung (81-83). Die genaue Bedeutung dieses Phänomens wird teilweise noch zu klären sein, die Beschreibung der enorm komplexen Regulation der eNOS insgesamt befindet sich in einem fortwährenden Prozess (57,58). Im Ganzen lässt sich zusammenfassen, dass eine Beeinflussung der eNOS-Aktivität in den verschiedensten physiologischen oder pathophysiologischen

Stoffwechselsituationen über eine Vielzahl von fein regulierten Mechanismen möglich ist.

NO moduliert die kardiale Funktion direkt, aber auch indirekt über Veränderungen der vaskulären Funktion (61). NO beeinflusst die myokardiale Kontraktilität und Relaxation ebenso wie die Herzfrequenz und den Gefäßtonus (57,58,61). Darüber hinaus kommt NO und besonders der eNOS offenbar eine wichtige Rolle im Rahmen des ventrikulären Remodelings zu (58,84), wobei sich in Tiermodellen mit eNOS-Überexpression oder eNOS-Knockout-Mäusen ein protektiver Effekt der eNOS zeigte (58). Veränderungen der NOS-Aktivität und des NO-Stoffwechsels gelten außerdem als bedeutende Faktoren in der Pathogenese der endothelialen Dysfunktion bei Herzinsuffizienz (85). Ferner deuten zahlreiche Untersuchungen zunehmend darauf hin, dass der kardioprotektive Effekt verschiedener Medikamentengruppen auch durch Modulation der eNOS zustande kommt. Derartige Beobachtungen wurden bei ACE-Hemmern, Angiotensin-II-Rezeptorblockern, Statinen und einigen Calciumkanalblockern publiziert (57). Der bedeutendste Signalweg von NO im kardiovaskulären System ist vermutlich die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (= sGC, soluble Guanylate Cyclase), welche die Konversion von GTP zum second messenger cGMP katalysiert (57,63). Das cGMP moduliert in vielfältiger Weise Effektoren wie Proteinkinasen, Ionenkanäle oder Phosphodiesterasen (86). Genauer beschrieben ist beispielsweise die Entstehung der vasodilatatorischen NO-Wirkung: In den glatten Muskelzellen der Gefäßwand bewirkt cGMP eine Aktivierung der Proteinkinase G, und diese führt über eine Myosin-Leichtketten-Phosphatase zur Dephosphorylierung des Myosins, was eine Relaxation der glatten Muskelzelle und damit eine Vasodilatation zur Folge hat (57). Neben der sGC/cGMP-Kaskade gibt es zahlreiche weitere Interaktionen und Wirkungsweisen von NO, deren Bedeutung im Einzelnen nicht geklärt ist. Darüber hinaus ist auch eine NOS-unabhängige NO-Produktion beschrieben.

Die Erkenntnisse über die Rolle des NO im kardiovaskulären System legen nahe, dass eine pharmakologische Beeinflussung der NO-Synthasen und insbesondere eine Verbesserung der eNOS-Funktion zu positiven Effekten im Hinblick auf ventrikuläres Remodeling und kardiale Funktion bei Herzinsuffizienz beitragen könnten. Das neu

entwickelte Medikament AVE9488 erhöhte die eNOS-Transkription und die NO-Produktion kultivierter humaner Endothelzellen. Überdies führte die Behandlung mit AVE9488 in Mäusen mit ApoE-Defizienz zu erhöhter vaskulärer eNOS-Expression und reduzierter Atherosklerose (87).

In der vorliegenden Arbeit sollen daher folgende Fragestellungen untersucht werden: Welche Auswirkungen hat die Behandlung mit AVE9488 auf ventrikuläre Funktion und Remodeling bei Ratten nach experimentellem Myokardinfarkt, d. h. wie entwickeln sich Hämodynamik, Ventrikelmorphologie und Fibrosierung? Welche Veränderungen beobachtet man im Hinblick auf eNOS-Expression und -Aktivität im überlebenden Myokard, wodurch kommen diese zustande? Beeinflusst die Therapie die linksventrikuläre Genexpression, und wie verhalten sich bestimmte Marker der Herzinsuffizienz?

2. Methoden

2.1 Studienprotokoll

Die vorliegende Studie wurde mit männlichen Wistar-Ratten durchgeführt (Charles River, Sulzfeld), die zum Zeitpunkt des experimentellen Myokardinfarkts 200-250 g schwer waren. Die Tiere wurden in Käfigen mit drei bis fünf Ratten gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter ad libitum. Durch Unterbringung in einem klimatisierten Tierstall und abwechselnde Hell-Dunkel-Perioden von jeweils 12 Stunden blieben die Umweltbedingungen weitgehend konstant.

Die Tiere wurden einer Operation mit Ligatur der linken Koronararterie unterzogen oder scheinoperiert, sieben Tage später wurde mit der Behandlung begonnen. Dazu wurden die überlebenden Tiere randomisiert und erhielten über einen Zeitraum von neun Wochen entweder den eNOS-Transkriptions-Verstärker AVE9488 oder Placebo. AVE9488 stammt von der Firma Aventis (Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt am Main), es handelt sich um eine niedermolekulare Substanz (4-fluoro-N-indan-2-yl-benzamide) mit oraler Bioverfügbarkeit (87). Die Substanzen waren dem Tierfutter beigemischt, das von Altromin (Gesellschaft für Tierernährung mbH, 32791 Lage) geliefert wurde. Nach Ende der Behandlungsdauer wurden hämodynamische Messungen durchgeführt und die Tiere anschließend getötet. Entsprechend den folgenden Beschreibungen wurde das Herz entnommen und für die weiteren Untersuchungen vorbereitet.

Nachstehende Einteilung in drei Gruppen liegt der Studie zugrunde:

Tiere ohne Infarkt, Behandlung mit Placebo (SHAM)
Tiere mit Infarkt, Behandlung mit Placebo (MI Pla)
Tiere mit Infarkt, Behandlung mit AVE 9488 (MI AVE9488)

2.2 Durchführung des experimentellen Myokardinfarkts

Als Tiermodell für die chronische Herzinsuffizienz wurde eine Methode in Anlehnung an Pfeffer et al. gewählt (88). Hierbei wird eine Ligatur des Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie bei Ratten durchgeführt. Nach dem Wiegen der Tiere erfolgte zunächst eine Narkotisierung mit Isofluran. Anschließend wurden die Ratten intubiert und mit einer speziellen Atempumpe für Nagetiere (Rodent Ventilator 7025, Ugo Basile) beatmet, wobei die Frequenz 90/min und das Atemzugvolumen 3,5 ml betragen. Zur Aufrechterhaltung der Narkose diente ein Tropfgerät, das eine kontinuierliche Zufuhr von Isofluran ermöglichte. Nach vorheriger Desinfektion erfolgte der linkslaterale Zugang zum Thorax, indem die Haut durch eine Schere durchtrennt und anschließend die Pectoralmuskulatur bis auf die Rippen präpariert wurde. Durch ein Spreizen der Rippen und Eröffnung des Herzbeutels konnte anschließend das Herz aus diesem herausgedrückt und der nun offen liegende Ramus interventricularis anterior der linken Herzkranzarterie mit Hilfe von nicht resorbierbarem Nahtmaterial (Prolene Monofil 5-0, Ethicon GmbH, Norderstedt) umstochen und ligiert werden. Nach Rückverlagerung des Herzens in seine normale Position wurde der Thorax schichtweise verschlossen. Etwa fünf Minuten postoperativ konnte man eine ausreichende Spontanatmung der Tiere beobachten, woraufhin die künstliche Beatmung beendet und die Tiere extubiert wurden. Die gleichen chirurgischen Maßnahmen wurden bei der Gruppe der scheinoperierten Tiere durchgeführt, wobei der Verschluss der Koronararterie unterblieb. An die Operation schloss sich eine fünfständige Beobachtungszeit der Ratten an, während der bei auftretenden Herzrhythmusstörungen eine Herz-Druck-Massage durchgeführt wurde. Die Letalität unter den infarzierten Tieren betrug in den ersten 24 Stunden postoperativ knapp 60 Prozent.

2.3 Hämodynamische Messungen

2.3.1 Prinzip des Conductance-Katheters

Zehn Wochen nach dem experimentellen Myokardinfarkt wurden eine Reihe von hämodynamischen Daten gemessen. Verwendet wurde dazu ein 1,4-French Katheter (Modell SPR-774, Mikro-Tip[®] Catheter Transducers, Millar Instruments, Houston, Texas, USA), der eine Kombination aus vier Platinelektroden zur Volumen- und einem Mikro-manometer zur Druckmessung darstellt (Abb. 2).

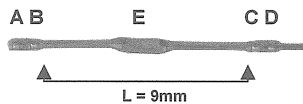


Abb. 2: Typischer Conductance-Katheter für Ratten. Die beiden äußeren Elektroden (A,D) generieren ein elektrisches Feld (20 kHz), die beiden inneren Elektroden (B,C) registrieren Spannungsänderungen im elektrischen Feld. L: Standard-Elektrodenabstand für Ratten E: Drucksensor

Die Technik der Volumenmessung mittels Conductance-Katheter geht auf Baan et al. zurück (89) und ist in ihrer Anwendung bei kleinen Labortieren noch relativ neu (erstmal 1996 bei Ratten etabliert, Ito et al (90)). Der Katheter wird über die Arteria carotis im linken Ventrikel positioniert. Die angeschlossene Conductance-Einheit ARIATM-1 (Millar Instruments) sendet ein konstantes Stromsignal im μA -Bereich über die äußeren Elektroden des Katheters, wodurch ein elektrisches Feld im linken Ventrikel entsteht. Der Widerstand des hindurchfließenden Blutes ändert sich während des Herzzyklus durch Kontraktion und Dilatation des Ventrikels, die resultierenden Spannungsänderungen werden durch die inneren Elektroden erfasst und sind umgekehrt proportional zum Volumen der Herzkammer. Das erfasste Signal wird amplifiziert, gefiltert (50Hz) und invertiert durch ARIATM-1, um ein analoges Messergebnis in Form von Relativen Volumeneinheiten (RVUs = Relative Volume Units) zu erhalten. Durch vorherige Kalibrierung ist eine Umwandlung der RVUs in absolute Volumeneinheiten möglich (siehe Abb. 3). Die Aufzeichnung der Druck-Volumen-Daten erfolgt mittels BioBench-

Software (National Instruments, USA), die eine Real-Time-Beobachtung von Druck-Volumen-Kurven erlaubt.



Abb. 3: Kalibrierungsküvette für Ratten. Die Katheterelektroden werden in zwei zylindrische Röhrchen bekannten Durchmessers eingetaucht, die mit heparinisiertem Blut gefüllt sind und das maximale und minimale erwartete linksventrikuläre Volumen repräsentieren. Eine lineare Interpolierung zwischen zwei Punkten (BioBench-Software) ermöglicht die Umwandlung von RVUs in absolute Volumeneinheiten (μl).

Die Berechnung des zeitabhängigen linksventrikulären Volumens $V(t)$ ist mit folgender Gleichung möglich:

$$V(t) = (1/\alpha \times \rho L^2) [G(t) - G_p]$$

Die Ermittlung des Volumens V [μl] mit Hilfe des Conductance-Katheters macht sich also dessen Proportionalität zum Leitwert G (= Conductance) [$1/\Omega$] zunutze. Berücksichtigt werden müssen dabei der spezifische Widerstand des Blutes ρ [$\Omega \text{ cm}$] und der Abstand der beiden mittleren Elektroden L [mm]. α ist ein dimensionsloser empirischer Faktor, der bei Ratten gleich 1,0 gesetzt werden kann (90). G_p [$1/\Omega$] ist die sog. Parallel Conductance, die folgendermaßen zustande kommt: Der durch die inneren Elektroden applizierte Strom fließt nicht nur durch das linksventrikuläre Blut, sondern zum Teil auch durch den umgebenden Herzmuskel, der ebenfalls als Leiter angesehen werden muss. Hierdurch würde ein falsch hoher Wert für das Blutvolumen im linken Ventrikel gemessen, weshalb eine Korrektur um G_p oder um das sog. Parallel Volume $V_p = (1/\alpha \times \rho L^2) G_p$ erfolgen muss, das vom kalibrierten Volumen abgezogen wird. Diese Korrektur kann nach einer von Baan et al. beschriebenen Methode (89) durch die Injektion hypertoner Kochsalzlösung durchgeführt werden.

2.3.2 Versuchsdurchführung

Zunächst erfolgte eine Narkotisierung der Tiere durch intraperitoneale Gabe von Pentobarbital (Narcoren[®], 30mg/kg Körpergewicht), anschließend wurden sie gewogen und auf einer beheizten Unterlage fixiert. Es folgten Intubation und Anschließen an die Atempumpe. Zwei mit Kochsalz gefüllte Polyethylen-Katheter (PE-50, Portex Limited, Hythe, Kent, UK) waren für die Messungen erforderlich. Zunächst wurde die Vena jugularis freipräpariert und über diese der erste Polyethylen-Katheter bis in den rechten Vorhof vorgeschoben. Anschließend erfolgte die Darstellung der rechten Arteria carotis und deren zweifache Ligatur mit 4-0 Permasidenfäden (Ethicon). Zwischen den beiden Ligaturen konnte man dann das Gefäß mit einer feinen Schere eröffnen und den zweiten Polyethylen-Katheter bis in den linken Ventrikel vorschieben. Eine Kontrolle der Lage war anhand der gemessenen Druckkurve möglich. Über einen Dreivegehahn war der Katheter mit einem Mikromanometer (Millar Tip-Catheter Pressure Transducer SPC-350, Millar Instruments) und einem Druckaufnehmer (Spektramed Statham P 50, Gould Inc., Kalifornien, USA) verbunden. Das so gewonnene linksventrikuläre Drucksignal wurde über ein modulares Biosystem (Mod.-Biosystem, ZAK, Simbach, Deutschland) mit Hilfe eines Achtkanalschreibers (Graphtec Linearrecorder Mark VII WR 3101, ZAK) aufgezeichnet. Gemessen wurden der linksventrikuläre systolische und enddiastolische Druck (LVSP und LVEDP) sowie die maximale Druckerhöhung- und Druckabfallgeschwindigkeit (dp/dt_{\max} und dp/dt_{\min}).

Nun erfolgten die Volumenmessungen mit Hilfe der oben beschriebenen Conductance-Technik. Hierzu wurde der genannte Katheter (SPR-774, Millar Instruments) über die Arteria carotis im linken Ventrikel platziert und in seiner Lage so lange korrigiert, bis sich eine optimale Form der Druck-Volumen-Kurven ergab. Bestimmt wurde das linksventrikuläre endsystolische bzw. enddiastolische Volumen. Zur Ermittlung des Parallel Volume V_p wurden 15 bis 20 μ l hypertonischer Kochsalzlösung über den Katheter in die Vena jugularis injiziert, was bei der Passage der Lösung durch den linken Ventrikel dort zu einer Veränderung der Leitfähigkeit des Bluts ρ führte. Durch die Injektion der Kochsalzlösung sollte die Leitfähigkeit des Blutes verändert werden, ohne gleichzeitig eine signifikante Druck- oder Volumenänderung im linken Ventrikel zu

induzieren. Die erfolgreiche Durchführung zeigte sich als Rechtsverschiebung der Druck-Volumen-Kurven. Die Daten wurden mittels PVAN 2.8-Software (Millar Instruments) erfasst, um so einen Wert für V_p zu erhalten (siehe Abb. 4)

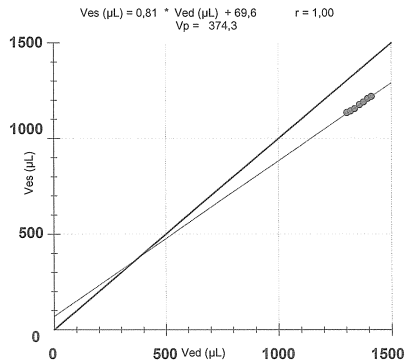


Abb. 4: Bestimmung von V_p : Das Parallel Volume wird mit Hilfe zweier linearer Gleichungen berechnet, wobei der Schnittpunkt der beiden Geraden ermittelt werden muss. Eine Gerade ergibt sich durch Auftragen der nach Kochsalz-Injektion erfassten Werte von V_{ed} und V_{es} , die andere Gerade repräsentiert die Funktion $V_{ed} = V_{es}$, d. h. gleiche endsystolische und enddiastolische Volumina, entsprechend einer blutleeren Herzkammer. Der Schnittpunkt der beiden Geraden entspricht dem Parallel Volume V_p .

Schließlich erfolgte die Berechnung der hämodynamischen Daten für jedes Tier mittels PVAN-Software, wobei alle durch BioBench-Software erfassten Kurven gemittelt wurden (nach vorheriger Korrektur um V_p).

2.4 Bestimmung der Infarktgröße

Nach Abschluss der hämodynamischen Messungen wurde das Herz der Tiere entnommen und in eiskalter isotoner Kochsalzlösung in Vorhöfe, rechten und linken Ventrikel inklusive interventrikuläres Septum aufgeteilt und gewogen. Anschließend erfolgte die Trennung des linken Ventrikels in drei transversale Teile: Spitze, mittlerer Ring (etwa drei Millimeter dick) und Basis. Zur Bestimmung der Infarktgröße wurden dann mit einem Mikrotom (Leica CM 1850, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) vom mittleren Ring 10 µm dicke Schnitte in 100µm-Intervallen angefertigt, auf einen Objektträger aufgebracht und mit Picosirius Red angefärbt. Diese Schnitte konnten nun in zehnfacher Vergrößerung in einem Mikroskop (Laborlux S, Leitz, Wetzlar) eingestellt werden, auf dem eine Videokamera (DLX-930 P, Sony, Japan) installiert war, mit deren Hilfe die Präparate eingescannt wurden. Dadurch war es möglich, die Infarktgröße mit dem Programm Sigma Scan Pro 2.0 (Jandel Scientific, USA) auszumessen. Hierzu wurden bei jedem Schnitt die endo- und epikardiale Ausdehnung der rot gefärbten Infarktnarbe sowie der endo- bzw. epikardiale Gesamtumfang bestimmt. Die Infarktgröße wurde als folgender Quotient definiert:

$$\frac{\frac{\text{Infarktbereich endokardial}}{\text{Gesamtumfang endokardial}} + \frac{\text{Infarktbereich epikardial}}{\text{Gesamtumfang epikardial}}}{2}$$

Nur Tiere mit einer Infarktgröße über 0,4 (entsprechend 40%) wurden in die Studie eingeschlossen.

2.5 Messung der linksventrikulären Genexpression

Zur Messung der linksventrikulären Genexpression erfolgte zunächst die Transkription der isolierten RNA in cDNA, welche anschließend mittels Real Time PCR amplifiziert und quantitativ bestimmt werden konnte. Gemessen wurde die Expression folgender Gene:

Endotheliale NO-Synthase (eNOS)
Atrial Natriuretic Peptide (ANP)
Brain Natriuretic Peptide (BNP)
Endothelin-1 (ET-1)
Glyzerin-aldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH)

2.5.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi (91) erfolgte aus Gewebeproben, die dem nichtinfarzierten Myokard des linken Ventrikels entnommen waren. Dies wurde unter Verwendung von TRIzol[®]-Reagenzlösung der Invitrogen GmbH, Karlsruhe, leicht modifiziert gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Versuche bei Raumtemperatur durchgeführt. Als weitere Reagenzien wurden dazu benötigt:

- Chloroform (Fluka Chemie AG, Buchs)
- Isopropranolol (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- 75% Ethanol (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- DEPC-Wasser (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- RNase-freies Wasser (GIBCO[™], Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

Mit Hilfe eines Pistills wurde zunächst das Gewebematerial in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser zu feinem Pulver zerrieben. Etwa 50 mg dieses Pulvers wurden dann sofort in ein vorbereitetes Eppendorf-Röhrchen mit 1 ml TRIzol[®]-

Reagenzlösung gegeben und gevortext. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit wurde die Probe mit 0,2 ml Chloroform versetzt und 15 Sekunden gut durchmischt. Es folgte eine erneute Inkubationszeit von zwei bis drei Minuten. Nach anschließendem Zentrifugieren (15 min, 11900 rpm, 4°C, Zentrifuge Hettich Universal 32 R) hatten sich drei Phasen gebildet, wobei sich die RNA ausschließlich in der obersten Phase befand. Diese konnte nun vorsichtig mit der Pipette in ein neues Eppendorf-Röhrchen übertragen werden. Durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol, Vermischen, zehnminütiges Inkubieren und nochmaliges Zentrifugieren (10 min, 11900 rpm, 4°C) präzipitierte die RNA und war dadurch als Pellet am Boden des Röhrchens sichtbar. Um das RNA-Präzipitat zu waschen, wurde der Überstand mit der Pipette entfernt, 1 ml 75% Ethanol zum Pellet pipettiert und nach kurzem Vortexen ein weiteres Mal zentrifugiert (5 min, 7370 rpm, 4°C). Das Ethanol wurde danach abpipettiert und das RNA-Pellet fünf bis zehn Minuten an der Luft getrocknet. Dann wurde die RNA je nach Menge des Ausgangsmaterials in 30-50 µl DEPC-Wasser gelöst und bei 55°C 10 Minuten inkubiert. Vor dem Aufbewahren der RNA bei -80°C wurden zur Bestimmung von Konzentration und Reinheit der Nukleinsäure drei Aliquots je Probe vorbereitet, indem jeweils 1 µl des Eluats mit 99 µl RNase-freiem, destilliertem Wasser verdünnt wurde. Nun konnte die optische Dichte (OD) bei 260 und 280 nm gemessen werden (Photometer Ultrospec 3100, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg). Eine optische Dichte von 1,0 bei 260 nm entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml, woraus sich folgende Beziehung ergibt:

$$\text{RNA } [\mu\text{g/ml}] = 40 \mu\text{g/ml} \times \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Quotient $\text{OD}_{260/280}$ stellt ein Maß für die Reinheit der RNA dar. Bei allen Proben lag dieser zwischen 1,8 und 2,0.

2.5.2 Durchführung der cDNA-Synthese

Für die reverse Transkription der RNA in cDNA in Anlehnung an eine Methode von Kawasaki et al. (92) wurde der Kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System der Invitrogen GmbH, Karlsruhe verwendet und damit jeweils 1 µg Gesamt-RNA nach den Empfehlungen des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Im gesamten Verfahren kamen RNase-freie Pipettenspitzen und Eppendorf-Röhrchen zum Einsatz. Da RNA oftmals Sekundärstrukturen ausbildet, wurde sie in einem Denaturierungsschritt zunächst mit einem dNTP-Mix, Oligo(dT)-Primern und DEPC-Wasser fünf Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend drei Minuten auf Eis gekühlt. Nach Zugabe eines vorbereiteten Reaktionsgemischs (10 x RT Buffer, 25 mM MgCl₂, 0,1 M DTT, RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor) folgte eine erneute Inkubation von nun zwei Minuten bei 42°C. Schließlich konnte das Enzym SuperScript™ II Reverse Transcriptase zugefügt und die cDNA-Synthese über 50 Minuten bei 42°C durchgeführt werden, bevor sie über 15 Minuten bei 70°C durch Inaktivierung des Enzyms beendet wurde. Nach dem letzten Inkubationsschritt folgte ein sofortiges Unterbrechen der Reaktion durch Kühlung der cDNA auf Eis. Nun wurde das Gesamtvolumen von 20 µl je Probe durch Zugabe von TE-Buffer zu jedem Reaktionsgefäß auf 100 µl verdünnt und die cDNA schließlich bei -20°C eingefroren.

2.5.3 Plasmid-Klonierung als Standard für die Real Time PCR

Die Klonierungen wurden unter Verwendung des TOPO TA Cloning®-Kit von Invitrogen durchgeführt. Der darin enthaltene Vektor pCR® 2.1-TOPO® liegt linearisiert vor und besitzt überstehende Thymidin-Reste an den 3'-Enden, an die das Enzym Topoisomerase I gebunden ist. Die Taq-Polymerase hat die Eigenschaft, jeweils an die 3'-Enden des PCR-Produkts ein zusätzliches Desoxyadenosin anzuhängen. Aufgrund dieser Beschaffenheiten ist eine effektive Klonierung des PCR-Produkts in den Vektor möglich.

In einem ersten Schritt wurde die cDNA mittels Standard-PCR amplifiziert und nach anschließender Gel-Elektrophorese unter UV-Licht betrachtet. Der Reaktionsansatz ist nachstehender Auflistung zu entnehmen, die genspezifischen Primer finden sich in Tab. 1 (siehe Seite 24):

cDNA	2 µl
10x PCR Buffer	5 µl
dNTPs	1 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
Forward bzw. Reverse Primer	je 1 µl
µl H ₂ O	39,5

Anschließend konnte die singuläre DNA-Bande mit Hilfe eines sterilen Skalpells ausgeschnitten und die Extraktion und Reinigung der DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt werden. Zur Klonierung wurde ein TOPO[®]-Cloning-Reaktionsansatz (Invitrogen) mit 3 µl des PCR-Produkts, 1 µl Salzlösung, 1 µl sterilem Wasser und 1 µl TOPO[®]-Vektor hergestellt, der nach kurzem Durchmischen fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich sofort auf Eis gestellt wurde.

Zur Transformation der Bakterienzellen kam ein Hitzeschock-Verfahren nach Cohen et al. (93) zur Anwendung. Hierzu wurden zunächst 2 µl des TOPO[®]-Cloning-Reaktionsansatz zu den Bakterienzellen (One Shot[®] Competent E. coli, Invitrogen) gegeben und das Gemisch 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die eigentliche Transformation erfolgte dadurch, dass der Reaktionsansatz für 30 Sekunden in ein 42°C warmes Wasserbad gestellt wurde. Durch diese abrupte Temperaturänderung soll das Plasmid ungehindert in die Zellen eindringen können. Es folgte wiederum ein sofortiges Kühlen auf Eis und nach Zugabe von 250 µl SOC Medium eine weitere Inkubation über eine Stunde bei 37°C auf einem Schüttler.

50-75 µl des Transformationsansatzes wurden dann mit Hilfe einer sterilen Öse auf einer vorgewärmten Selektionsplatte (X-Gal/IPTG) ausgestrichen; eine Inkubation über Nacht bei 37°C schloss sich an. Am nächsten Tag konnte man eine Blau-Weiß-Selektion der Bakterienkolonien beobachten. Dieser Selektion liegt folgendes zugrunde:

Nur die Plasmide besitzen als sog. Marker-Gen das lacZ-Gen, das für das Enzym β -Galaktosidase kodiert. Diese setzt X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid) zu 5-Brom-4-chlorindoxyl um, das an der Luft zum Farbstoff 5,5-Dibrom-4,4-dichlorindigo oxidiert wird, durch den die Kolonien blau erscheinen. Der Einbau von Fremd-DNA in das Plasmid führt dazu, dass keine funktionsfähige β -Galaktosidase mehr gebildet werden kann, so dass die betreffenden Bakterien in Anwesenheit von X-Gal farblos bleiben. IPTG (Isopropyl-thio-galaktosid) dient der Induktion des lacZ-Gens.

Nur die weißen Klone wurden auf einer neuen Agar-Platte ausgestrichen. Eine Analyse der positiven Klone wurde mittels Standard-PCR und Gel-Elektrophorese durchgeführt. Lediglich jene Klone, die auch das erwartete PCR-Produkt lieferten, wurden wiederum über Nacht bei 37°C weiterkultiviert, und zwar in 4 ml LB Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin. Die Plasmide wurden schließlich mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) den Angaben des Herstellers folgend extrahiert und gereinigt. Eine Bestätigung der erfolgten Klonierung erfolgte durch Sequenzierung (T7 Promoter).

2.5.4 Real Time PCR

Die Durchführung der Real Time PCR erfolgte im iCycler iQ™ (Bio-Rad) unter Verwendung von TaqMan-Sonden. Hierzu wurden zunächst je 2 μ l cDNA bzw. 2 μ l der klonierten Plasmid-DNA in einen Reaktionsansatz mit 12,5 μ l IQ Supermix (Bio-Rad), 5,5 μ l PCR-reinem H₂O, 2 μ l Mg Cl₂ und je 1 μ l der genspezifischen Primer sowie der genspezifischen Sonde pipettiert. Die Nukleotidsequenzen der entsprechenden Primer und Sonden sind Tab. 1 (siehe Seite 24) zu entnehmen.

Bei der Real Time PCR, die auf Higuchi et al. zurückgeht (94), wird neben den für die Amplifikation benötigten Primern der Reaktion ein weiteres Oligonukleotid zugesetzt, das als Gensonde spezifisch an das entstehende PCR-Produkt bindet. Wesentliches Prinzip dieser Methode ist die Markierung der Sonde mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen.

mRNA	Sequenz (5' → 3') des Primers	Acc.Nr.
GAPDH	(se.) - AAGCTGGTCATCAATGGGAAAC (as.) - GAAGACGCCAGTAGACTCCACG Probe - ATCTCCAGGAGCGCATCCCC	M17701
ANP	(se.) - AAATCCCGTATACAGTGCGG (as.) - GGAGGCATGACCTCATCTTC Probe - TCAAGAACCTGCTAGACCACCTGGAGGAGA	M27428
BNP	(se.) - CCAGAACAATCCACGATGC (as.) - TCGAAGTCTCCTGGATCC Probe - ACAGCTCTCAAAGCACCAAGGCCCTACA	RATBNP
ET-1	(se.) - CTCCTCCTTGATGGACAAGC (as.) - CTTGATGCTGTTGCTGATGG Probe - AGCAGCTGGTGGAGGAAGAAA	RATET1
eNOS	(se.) - CCAATTACTGCCAAGGCTGACT (as.) - GGGTGGATTGCTGCTCTCTGT Probe - TCTCCACAGAAAGAATTGTAGCCTGGAACATCT	U02534

Tab. 1: Nukleotidsequenz der genspezifischen Primer bzw. Sonden

se. = sense

as. = antisense

Man bezeichnet diese auch als Reporterfarbstoff (am 5'-Ende) und Quencherfarbstoff (am 3'-Ende). Verwendet wurden 6-Carboxyfluorescein (FAM) als Reporter und 6-Carboxytetramethyl-rhodamin (TAMRA) als Quencher. Die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs wird zunächst durch die Nähe zum Quencherfarbstoff absorbiert (Fluorescence Resonance Energy Transfer = FRET). Während der Neustrangsynthese schneidet die Taq-Polymerase aufgrund ihrer 5'-3'-Exonuclease-Aktivität die Sonde in kleine Fragmente, wodurch die beiden Farbstoffe voneinander getrennt werden. Hierdurch kommt es nun zu einer Zunahme des Fluoreszenzsignals. Dieser Anstieg ist proportional zur Menge des Templates im ursprünglichen Ansatz und ermöglicht damit eine quantitative Bestimmung des Zielgens. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe des sog. Schwellenwertzyklus (Threshold Cycle = C_t), der denjenigen Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant die Hintergrundfluoreszenz überschreitet. Anhand der C_t -Werte einer Standard-Eichkurve bekannter DNA-Konzentrationen kann nun die Anzahl der ursprünglichen Templates errechnet werden.

2.6. Proteinanalyse

2.6.1 Proteinextraktion

In analoger Weise zum Vorgehen bei der RNA-Isolierung erfolgte auch die Proteinextraktion aus dem überlebenden nichtinfarzierten linken Ventrikel. Hierzu wurde das Gewebe wiederum in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser zu einem feinen Pulver zerkleinert und in 300 μ l RIPA-Puffer lysiert, der folgendermaßen zusammengesetzt war:

NaCl	150 mmol/l
Tris-Cl	50 mmol/l
EDTA	5mmol/l
Nonidet P-40	1% v/v
Desoxycholat	0,5 %w/v
NaF	10mmol/l
Natriumpyrophosphat	10mmol/l
Phenylmethylsulfonylfluorid	100mmol/l
Aprotinin	2 μ g/ml
Leupeptin	2 μ g/ml

Nach Verflüssigung wurde dieses in ein Eppendorf-Röhrchen pipettiert und anschließend zentrifugiert (20min, 8000g, 4°C). Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80°C zur späteren Bearbeitung eingefroren.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der einzelnen Proben erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Kits (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories GmbH, München), basierend auf der Methode von Bradford (1976 (95)). Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden 1,5, 2,5, 5, 7,5 und 10 μ l einer BSA-Lösung (1 μ g/ μ l) durch Zugabe von Wasser auf ein Endvolumen von 800 μ l eingestellt. Je 5 μ l der Proben wurden mit 795 μ l Wasser versetzt. Nach Zugabe von 200 μ l Biorad-Protein-Assay-Lösung, anschließendem Vortexen und fünfminütiger Inkubationszeit konnte die optische Dichte der Standards und Proben bei 595 nm gemessen werden.

2.6.2 Western Blot

Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen von eNOS und am Serinrest Ser¹¹⁷⁷ phosphorylierter eNOS wurden die Proteine mittels SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das Polyacrylamidgel bestand aus einem Sammel- und aus einem Trenngel folgender Zusammensetzung:

	Trenngel (12% Acrylamid)	Sammelgel (3% Acrylamid)
Acrylamid/Bis-Acrylamid 30:0,8 (w/v)	4ml	0,815 ml
4xTris-HCl-SDS pH 8,8 / 6,8	5ml	1,564 ml
A. dest	7ml	3,813 ml
APS 10 %	66,6 µl	31,3 µl
TEMED	13,36 µl	6,25 µl

Während der Polymerisation der Gele erfolgte die Vorbereitung der Proteinproben, indem jeweils 40 µl der normalisierten Proben mit 20 µl Loading Buffer (1:9 DTT:SDS) versetzt, fünf Minuten aufgeköcht und anschließend auf Eis gekühlt wurden. Nach anschließendem Auftragen von jeweils 15 µl pro Tasche folgte das Laden jedes Gels mit Prestained Precision Broad Range (Bio-Rad) als Molekulargewichtsmarker zur Identifizierung der Banden. Ein Sammellauf mit 60 V und 15 mA sowie ein Trennlauf mit 150 V und 20 mA schlossen sich an.

Zur Immobilisation der Proteine erfolgte nun der Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran (Immun-Blot[®] 0,2 µm, Bio-Rad), nachdem diese zuvor mit einem Transferpuffer äquilibriert wurde. Hierfür wurde das Trenngel nach Entnahme aus der Kammer in ein Transfersandwich eingebettet, in dem von der Kathodenseite zur Anodenseite Schaumstoff, Filterpapier, Trenngel, PVDF-Membran und wiederum Filterpapier und Schaumstoff übereinander geschichtet wurden. Das Blotting erfolgte über 60 Minuten mit 100 V. Nach dem Transfer der Proteine wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran durch Zugabe von TBST (Tris-buffered Saline Tween) mit 5 % ECL-Blocking Agent (Amersham Biosciences) und Inkubation über Nacht blockiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran mit dem jeweils spezifisch gegen das entsprechende Protein gerichteten Primärantikörper bei Raumtemperatur unter Zugabe von TBST mit 0,5 % ECL-Blocking Agent leicht schüttelnd zwei Stunden inkubiert. Nach dem Ende der Inkubationszeit folgte mehrfaches Waschen mit TBST, bevor der Sekundärantikörper zugegeben werden konnte, der an den Primärantikörper bindet. Die Konjugation des Sekundärantikörpers mit Meerrettich-Peroxidase ermöglichte nun den Nachweis der spezifischen Banden durch eine Chemilumineszenz-Reaktion. Dies wurde unter Verwendung eines kommerziellen Kits (ECL Plus, Amersham Biosciences) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Auswertung wurde zunächst ein Autoradiographie-Films (ECL HyperfilmTM, Amersham Biosciences) belichtet, bevor die Banden densitometrisch mit Hilfe von Scion Image for Windows Beta 4.0.2 (Scion Corporation, USA) gemessen wurden.

2.7 Messung der linksventrikulären Kollagenmenge

Die quantitative Messung der linksventrikulären Kollagenmenge erfolgte nach einer Methode in Anlehnung an Whittaker et al (96). Die Messung erfolgte im nicht-infarzierten Teil des Ventrikels bzw. des interventrikulären Septums. Hierzu wurden die Herzen in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet, bevor 7 µm dicke Schnitte angefertigt und nach Aufbringen auf einen Objektträger mit Picosirius Red angefärbt wurden. Die Kollagenmessung wurde mit Hilfe eines Videoanalyse-System durchgeführt, das aus einem Mikroskop (Laborlux S, Leitz, Wetzlar), einer aufmontierten Videokamera (DLX-930 P, Sony, Japan) und dem Programm Sigma Scan Pro 2.0 (Jandel Scientific, USA) bestand. Aus jedem scheinoperierten und aus jedem infarzierten Herzen wurden drei Regionen des interventrikulären Septums zufällig ausgewählt und hiervon mit dem beschriebenen System jeweils zwei Aufnahmen angefertigt: zunächst eine Hellfeld-Aufnahme durch einen Blaufilter, der rote Farbtöne absorbiert (Schott BGS23 3.0, Itos, Gesellschaft für Technische Optik mbH, Mainz), anschließend eine Aufnahme mit polarisiertem Licht. Beide wurden als monochromatische Bilder abgespeichert (siehe Abb. 5, A und B).

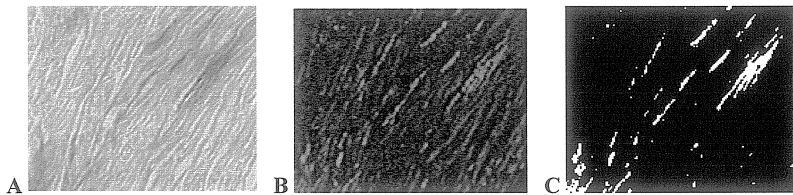


Abb. 5: A = mit Hilfe des Blaufilters angefertigtes Bild; B = Aufnahme desselben Feldes mit polarisiertem Licht; C = binäres Bild (nach Subtraktion B-A und anschließender binärer Umwandlung), der Prozentsatz weißer Pixel repräsentiert die Kollagenmenge.

Die mit dem Blaufilter erzeugte Aufnahme wurde nun von dem mit polarisiertem Licht angefertigten Bild subtrahiert, wodurch ein Bild mit grauen Kollagenfasern auf einem schwarzen Hintergrund entstand. Dieser Hintergrund entsprach den kardialen Myozyten bzw. dem interstitiellen Raum. Jedes Pixel mit einer Graustufe größer Null (Schwarz = Null) entsprach hingegen Kollagen. Mit Hilfe einer binären Umwandlung dieses Bildes konnte man nun die Kollagenquantifizierung vornehmen, da nun diese Pixel weiß auf einem schwarzen Hintergrund erschienen (siehe Abb.5, C). Die Kollagenmenge wurde durch den Anteil der weißen Pixel im Bild repräsentiert. Diese ließen sich schließlich aus dem binären Bild mit Hilfe von Scion Image Beta 4.02 (Scion Corporation, USA) berechnen.

2.8 Bestimmung der NOS-Aktivität

Zur Bestimmung der NOS-Aktivität im linken Ventrikel kam eine Methode von Tsikas et al. (97) etwas modifiziert zur Anwendung, bei der die NOS-Aktivität als Umsetzung von L-[Guanidino- $^{15}\text{N}_2$]Arginin zu [^{15}N]Nitrat gemessen wurde. Nitrat ist ein Metabolisierungsprodukt von NO, L-Arginin Substrat der NO-Synthasen.

Als erster Schritt wurde zunächst Gewebe aus dem nichtinfarzierten Teil des linken Ventrikels in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser zu einem feinen Pulver zerkleinert und anschließend in eiskaltem TRIS-Puffer homogenisiert. Nachstehende Übersicht zeigt die Zusammensetzung des Puffers:

Tris-HCl pH 7.4	50 mmol/l
CHAPS	10 mmol/l
EGTA	2 mmol/l
DTT	1 mmol/l
Pepstatin	1 μ mol/l
Leupeptin	2 μ mol/l
PMSF	1 mmol/l

Es folgte zehnminütiges Zentrifugieren bei 4000g und 4 °C. Danach wurde der Überstand in den vorbereiteten Inkubationspuffer pipettiert. In diesem waren die benötigten Kofaktoren der NO-Synthase in folgenden Konzentrationen gelöst:

Tris-HCl pH 7.4	50 mmol/l
BH ₄	10 μ mol/l
FAD	5 μ mol/l
FMN	5 μ mol/l
CaCl ₂	5 mmol/l
Calmodulin	0,5 μ mol/l
NADPH	1 mmol/l

Zur Messung der Calcium-unabhängigen NOS-Aktivität wurde EGTA (5 mmol/l) anstelle von CaCl₂/Calmodulin verwendet. Des Weiteren wurden 5mmol/l L-[Guanidino-¹⁵N₂]Arginin zugegeben und die Proben dann 60 Minuten bei 37° inkubiert. Mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie konnte nun die Konzentration an [¹⁵N]Nitrat als Marker der NOS-Aktivität gemessen werden.

2.9 Statistische Auswertung

Alle Daten der vorliegenden Studie sind als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zwei-faktorieller Varianzanalyse (ANOVA-Test, StatView 5.0, SAS Institute Inc., USA). Die Nullhypothese wurde bei Überschreiten eines Wahrscheinlichkeitsniveaus von 95 % verworfen ($p < 0,05$)

3. Ergebnisse

3.1 Infarktgröße, Ventrikelmorphologie und Hämodynamik

Nach Abschluss der neunwöchigen Behandlung zeigte sich eine vergleichbare Infarktgröße der mit Placebo behandelten Ratten und der Tiere, die den eNOS-Transkriptions-Verstärker AVE 9488 erhalten hatten. Tab. 2 zeigt Daten zu Infarktgröße, Ventrikelmorphologie und Hämodynamik.

In allen drei Studiengruppen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in Bezug auf das Körpergewicht der Tiere. Signifikante Unterschiede bezüglich der Herzfrequenz wurden nur zwischen den Gruppen „Sham“ und „MI Placebo“ gemessen.

Tab. 2: Daten zu Infarktgröße, Ventrikelmorphologie und Hämodynamik nach Scheinoperation (Sham) oder neunwöchiger Behandlung infarzierter Tiere mit Placebo (MI Placebo) bzw. dem eNOS-Transkriptions-Verstärker AVE 9488 (MI AVE9488).

	Sham	MI Placebo	MI AVE9488
n	10	12	12
Infarktgröße (%)	-	49.6±1.2	49.5±2.2
Gewicht (g)	523±26	490±10	456±11
Herzfrequenz (bpm)	390±14	335±20*	348±19
RV (g)	0.21±0.01	0.49±0.03*	0.34±0.03*†
LV (g)	0.80±0.04	0.86±0.03	0.81±0.05
LVSP (mmHg)	146±3	112±2*	118±5*
LVESV (µl)	227±12	810±45*	534±75*†
dP/dt _{min} (mmHg/s)	9150±474	4844±302*	6257 ±569*‡

*p<0,05 vs. Sham; ‡p<0,05 bzw. †p<0,01 vs. MI Placebo

LV (g) = Gewicht des linken Ventrikels

RV (g) = Gewicht des rechten Ventrikels

LVSP (mmHg)= linksventrikulärer systolischer Druck

LVESV (µl) = linksventrikuläres endsystolisches Volumen

dP/dt_{min} = maximale Druckabfallsgeschwindigkeit

Im Vergleich zur Gruppe der scheinoperierten Tiere konnte man in der Infarktgruppe ein deutlich höheres Gewicht des rechten Ventrikels beobachten, das durch die Behandlung mit AVE 9488 signifikant reduziert wurde. Auch das Gewicht des linken Ventrikels stieg nach Myokardinfarkt an und wurde durch AVE9488 nahezu normalisiert, allerdings war der Unterschied hierbei nicht signifikant.

Wie Tab. 2 zu entnehmen ist, zeigte sich eine signifikante Verringerung des linksventrikulären systolischen Drucks (LVSP) bei infarzierten Tieren, unabhängig von der Art der Behandlung.

Abb. 6 zeigt die Unterschiede im Hinblick auf den linksventrikulären enddiastolischen Druck (LVEDP) in den drei Studiengruppen.

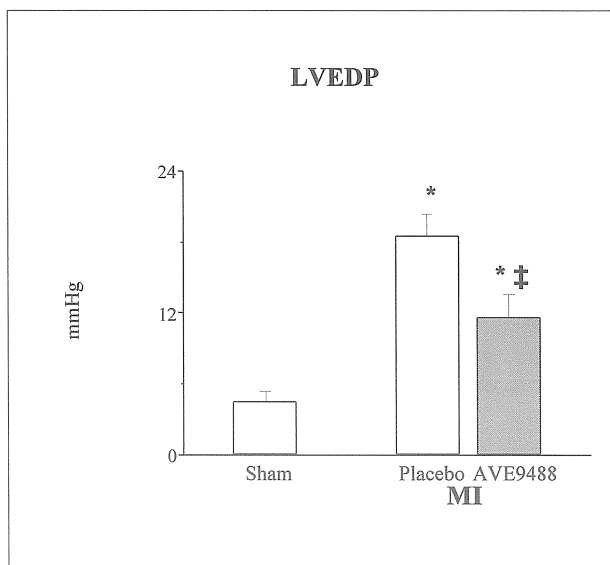


Abb. 6: Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP) zehn Wochen nach Scheinoperation (Sham) oder Myokardinfarkt (MI). Die Behandlung der Tiere erfolgte beginnend am siebten postoperativen Tag über neun Wochen mit Placebo oder dem eNOS-Transkriptions-Verstärker AVE9488. * $p < 0,05$ vs. Sham; ‡ $p < 0,05$ vs. MI Placebo

Wie in Abb. 6 zu erkennen, war der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) in der Placebo-Gruppe deutlich erhöht. Dies deutet ebenso wie die erheblich verringerte maximale Druckerstiegs- bzw. Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt_{\max} bzw. dP/dt_{\min}) auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz bei den Tieren der Placebo-Gruppe hin (siehe Tab. 2 bzw. Abb. 7). Alle drei Parameter wurden durch die Behandlung mit AVE9488 signifikant verbessert.

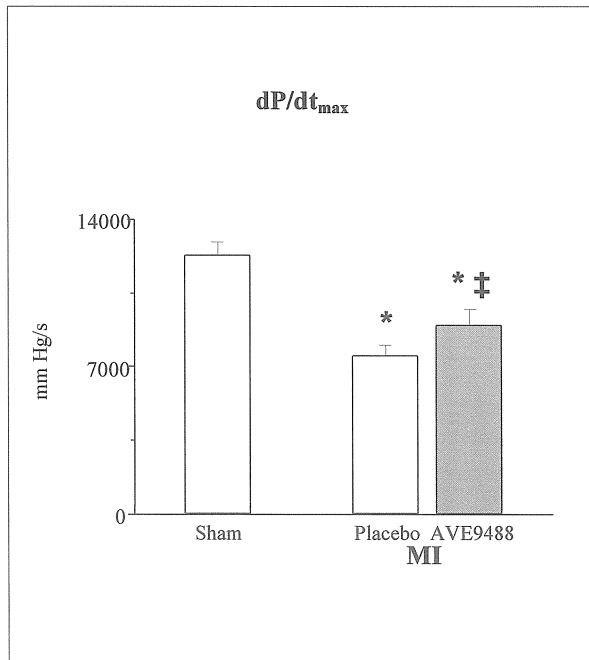


Abb. 7: Linksventrikuläre maximale Druckerstiegs- bzw. Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt_{\max}) zehn Wochen nach Scheinoperation (Sham) oder Myokardinfarkt (MI). Die Behandlung der Tiere erfolgte beginnend am siebten postoperativen Tag über neun Wochen mit Placebo oder dem eNOS-Transkriptions-Verstärker AVE9488. * $p < 0,05$ vs. Sham; ‡ $p < 0,05$ vs. MI Placebo

Mittels Conductance-Katether erfolgten Druck-Volumen-Messungen, deren Ergebnisse in Tab. 2 bzw. Abb. 8 dargestellt sind.

Das linksventrikuläre endsystolische Volumen (LVESV) stieg ebenso wie das enddiastolische Volumen (LVEDV) nach Myokardinfarkt deutlich an. Beide Parameter konnten durch die Behandlung mit AVE9488 erheblich reduziert werden, wobei sich jeweils eine statistische Signifikanz ergab.

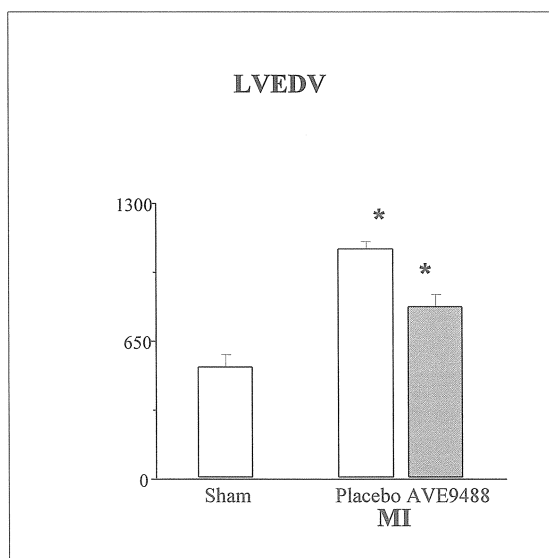


Abb. 8: Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (LVEDV) zehn Wochen nach Scheinoperation (Sham) oder Myokardinfarkt (MI). Die Behandlung der Tiere erfolgte beginnend am siebten postoperativen Tag über neun Wochen mit Placebo oder dem eNOS-Transkriptions-Verstärker AVE9488. * $p < 0,05$ vs. Sham; † $p < 0,01$ vs. MI Placebo

Unter Verwendung des Conductance-Katheters war es außerdem möglich, linksventrikuläre Druck-Volumen-Kurven zur weiteren Beurteilung der Herzfunktion aufzuzeichnen. Im Rahmen der Messungen wurde eine typische Rechtsverschiebung dieser Kurven nach Myokardinfarkt beobachtet, diese konnte durch die Behandlung mit AVE9488 zum Teil verhindert werden (siehe Abb. 9).

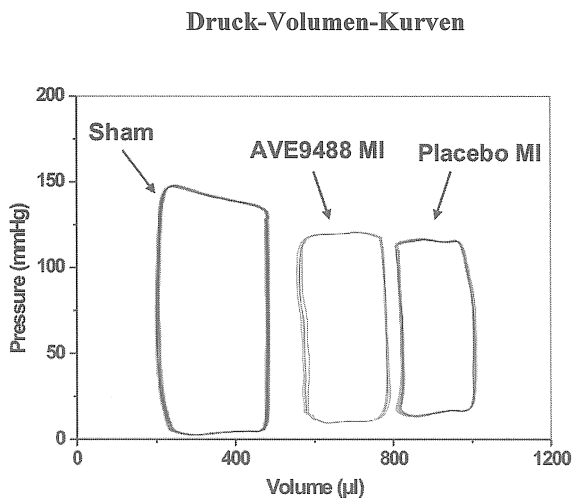


Abb. 9: Druck-Volumen-Kurven des linken Ventrikels. Man erkennt die Rechtsverschiebung in der Infarktgruppe. Die Fläche innerhalb jeder Druck-Volumen-Kurve repräsentiert die Herzarbeit während eines Herzzyklus. Außerdem ist das Schlagvolumen im Diagramm als Abstand der beiden oberen Punkte jeder Schleife ablesbar. Zu sehen ist auch, dass die Behandlung mit AVE9488 die typischen Veränderungen nach Myokardinfarkt teilweise antagonisiert.

3.2 Expression und Aktivität der eNOS

Um den Einfluss von AVE9488 auf Expression und Aktivität der eNOS zu charakterisieren, wurden verschiedene Parameter im linken Ventrikel untersucht. Es erfolgten Messungen der durch AVE9488 hervorgerufenen Veränderungen der myokardialen eNOS auf der Ebene der Gen- und der Proteinexpression. Darüber hinaus wurden in allen drei Studiengruppen die Phosphorylierung und Aktivität der eNOS gemessen.

Im linken Ventrikel erfolgte die Bestimmung der Genexpression der eNOS mittels Real Time PCR nach vorheriger RNA-Extraktion und cDNA-Synthese. Wie erwartet war hierbei zu beobachten, dass AVE 9488 zu einer Erhöhung der eNOS-Konzentration im linken Ventrikel führt. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Tieren, die mit Placebo behandelt wurden und jenen, die AVE 9488 erhielten, was Abb. 10 zu entnehmen ist.

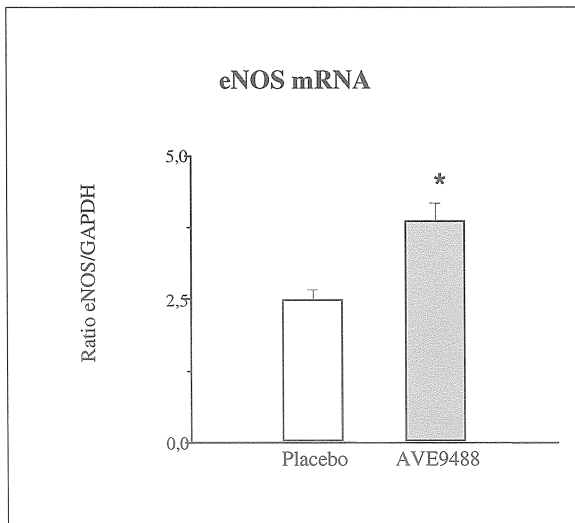


Abb. 10: eNOS mRNA im linken Ventrikel, dargestellt als Verhältnis eNOS/GAPDH. Die Behandlung der Tiere erfolgte beginnend am siebten postoperativen Tag über neun Wochen mit Placebo oder dem eNOS-Transkriptions-Verstärker AVE9488. * $p < 0,05$ vs. Placebo

Darüber hinaus wurde die Proteinexpression der eNOS im linken Ventrikel untersucht. In analoger Weise ergab sich auch hierbei eine Erhöhung der eNOS-Konzentration in der mit AVE9488 behandelten Gruppe. Diese Daten wurden mittels Western-Blot-Analyse erhoben. Ein repräsentatives Beispiel in Abb. 11 veranschaulicht dieses Ergebnis.

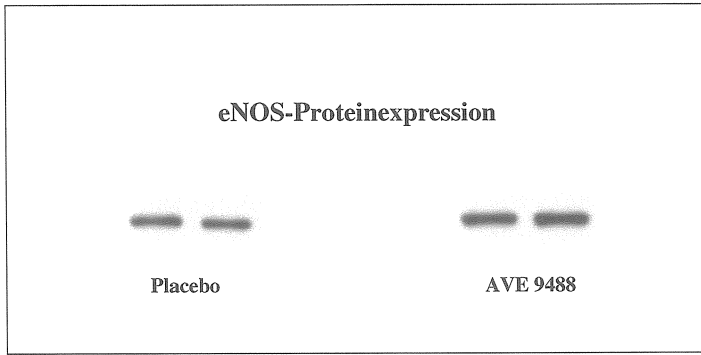


Abb. 11: eNOS-Proteinexpression im linken Ventrikel, ermittelt durch Western-Blot-Analyse. Die Behandlung der Tiere erfolgte beginnend am siebten postoperativen Tag über neun Wochen mit Placebo oder dem eNOS-Transkriptions-Verstärker AVE9488.

Weitere Hinweise auf die Wirkungsweise von AVE9488 konnten durch die Bestimmung der phosphorylierten eNOS (phospho-eNOS) gewonnen werden. Untersucht wurde hierbei das am Serinrest 1177 (Ser¹¹⁷⁷) phosphorylierte Enzym. Diese Daten wurden ebenfalls mittels Western-Blot-Analyse ermittelt.

Abb. 12 zeigt die Konzentration der phospho-eNOS im Verhältnis zur eNOS. Deutlich zu erkennen ist die signifikant verringerte Phosphorylierung nach Myokardinfarkt. Diese Verringerung führt wie im Einleitungstext beschrieben zu einer verminderten Aktivität des Enzyms (69,70). Durch die Therapie mit AVE9488 wurde die Phosphorylierung hingegen wieder normalisiert.

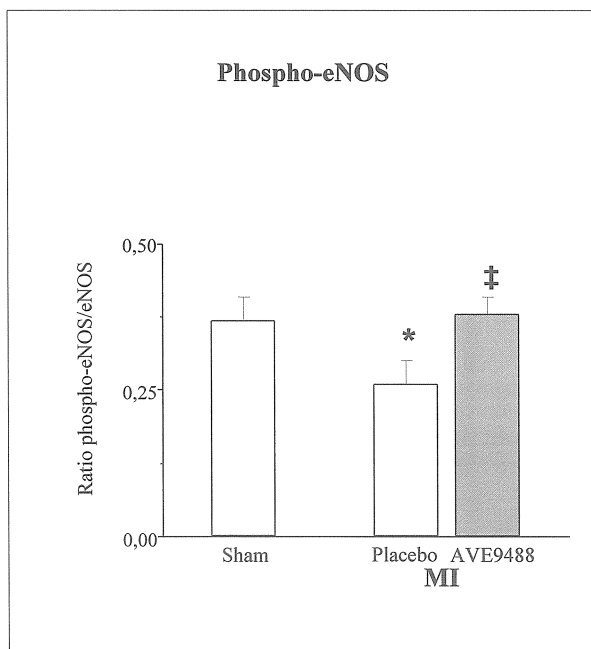


Abb. 12: Verhältnis phospho-eNOS/eNOS: Das Verhältnis der Proteinkonzentration der am Serinrest 1177 phosphorylierten endothelialen NO-Synthase (phospho-eNOS) zur endothelialen NO-Synthase (eNOS) wurde zehn Wochen nach Scheinoperation (Sham) oder Myokardinfarkt (MI) bestimmt. Die Behandlung der Tiere erfolgte beginnend am siebten postoperativen Tag über neun Wochen mit Placebo oder dem eNOS-Transkriptions-Verstärker AVE9488. * $p < 0,05$ vs. Sham; ‡ $p < 0,05$ vs. MI Placebo

Ein ähnliches Ergebnis war bei der Messung der kalzium-abhängigen NOS-Aktivität zu beobachten. Sowohl die verminderte Aktivität nach Myokardinfarkt als auch die weitgehende Normalisierung durch die Therapie waren statistisch signifikant (Abb. 13):

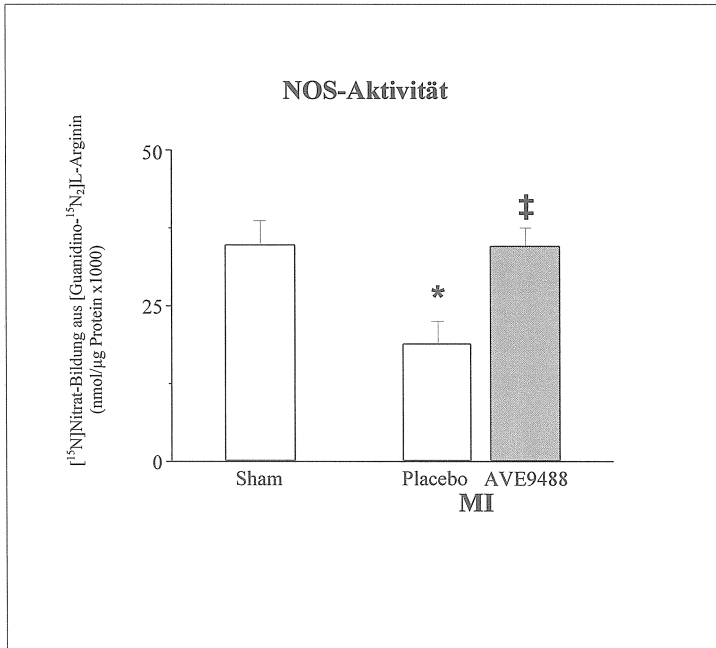


Abb. 13: NOS-Aktivität, gemessen als Umsetzung von L-[Guanidino-¹⁵N₂]Arginin zu [¹⁵N]Nitrat im linken Ventrikel zehn Wochen nach Scheinoperation (Sham) oder Myokardinfarkt (MI). Die Behandlung der Tiere erfolgte beginnend am siebten postoperativen Tag über neun Wochen mit Placebo oder dem eNOS-Transkriptions-Verstärker AVE9488. *p<0,05 vs. Sham; ‡p<0,05 vs. MI Placebo

3.3 Linksventrikuläre Genexpression

In analoger Weise zum Vorgehen bei der Bestimmung der endothelialen NO-Synthase wurde die Expression weiterer Gene im linken Ventrikel mittels Real Time PCR nach vorheriger RNA-Extraktion und cDNA-Synthese gemessen. Von besonderem Interesse waren hierbei die natriuretischen Peptide ANP und BNP als bekannte Marker einer Herzinsuffizienz. Es zeigte sich ein enormer Anstieg von ANP nach Myokardinfarkt auf ein Vielfaches der Ausgangswerte scheinoperierter Tiere. Dieser Anstieg konnte durch die Behandlung mit AVE9488 statistisch signifikant reduziert werden, wie Abb. 14 zu entnehmen ist:

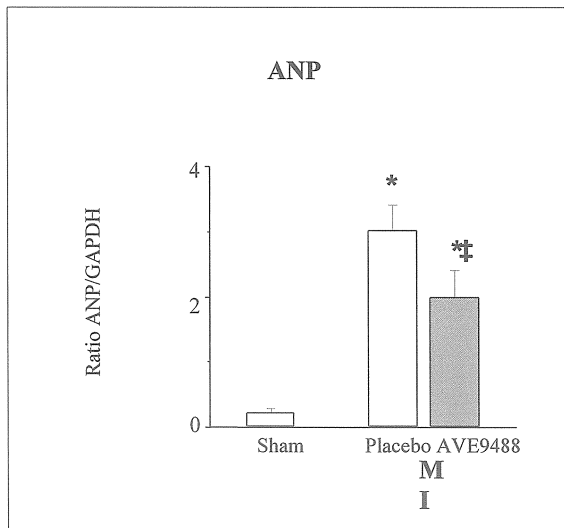


Abb. 14: ANP = Atrial Natriuretic Peptide, dargestellt als Verhältnis ANP/GAPDH. Das Verhältnis wurde zehn Wochen nach Scheinoperation (Sham) oder Myokardinfarkt (MI) bestimmt. Die Behandlung der Tiere erfolgte beginnend am siebten postoperativen Tag über neun Wochen mit Placebo oder dem eNOS-Transkriptions-Verstärker AVE9488. * $p < 0,05$ vs. Sham; ‡ $p < 0,05$ vs. MI Placebo

Vergleichbare Veränderungen durch Infarkt und Behandlung wurden bei der Messung der BNP-Konzentration beobachtet (siehe Abb.15):

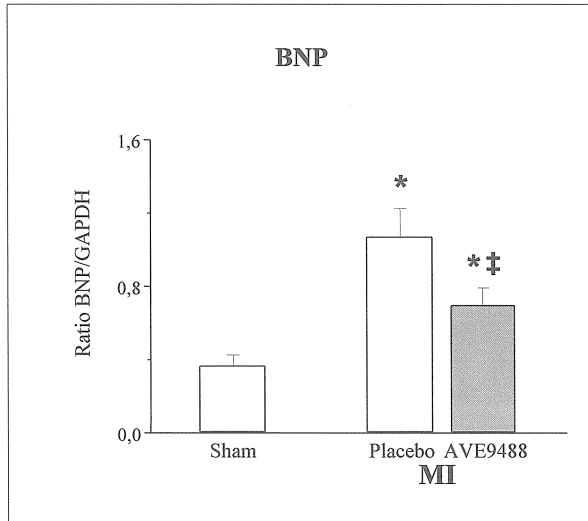


Abb. 15: BNP = Brain Natriuretic Peptide, dargestellt als Verhältnis BNP/GAPDH. Das Verhältnis wurde zehn Wochen nach Scheinoperation (Sham) oder Myokardinfarkt (MI) bestimmt. Die Behandlung der Tiere erfolgte beginnend am siebten postoperativen Tag über neun Wochen mit Placebo oder dem eNOS-Transkriptions-Modulator AVE9488. * $p < 0,05$ vs. Sham; ‡ $p < 0,05$ vs. MI Placebo

Schließlich wurde noch die linksventrikuläre Genexpression von Endothelin-1 untersucht. Auch hier war erwartungsgemäß ein Anstieg nach Myokardinfarkt zu beobachten, der durch die Behandlung mit AVE9488 wiederum sehr deutlich reduziert werden konnte (siehe Abb. 16, nächste Seite).

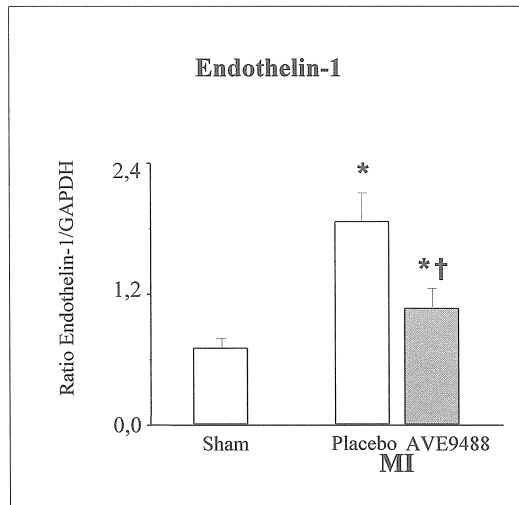


Abb. 16: Verhältnis Endothelin-1/GAPDH: Das Verhältnis wurde zehn Wochen nach Scheinoperation (Sham) oder Myokardinfarkt (MI) bestimmt. Die Behandlung der Tiere erfolgte beginnend am siebten postoperativen Tag über neun Wochen mit Placebo oder dem eNOS-Transkriptions-Modulator AVE9488. * $p < 0,05$ vs. Sham; † $p < 0,01$ vs. MI Placebo

3.4 Linksventrikuläre Fibrosierung

Im Rahmen des linksventrikulären Remodelings ist auch die linksventrikuläre Fibrosierung von besonderem Interesse. Diese wurde in der vorliegenden Studie nach der in Abschnitt 2.7 beschriebenen Methode mit Hilfe von polarisiertem Licht gemessen. Erwartungsgemäß fand sich in der Placebo-Gruppe eine deutlich vermehrte Fibrosierung. Die Behandlung mit AVE9488 führte hingegen zu einer hochsignifikanten Reduzierung dieser Fibrose (siehe Abb. 17, nächste Seite).

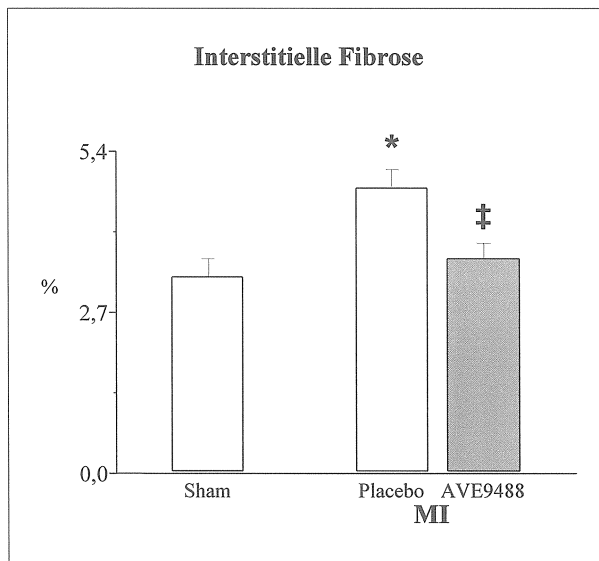


Abb. 17: Interstitielle Fibrose im linken Ventrikel und im interventrikulären Septum zehn Wochen nach Scheinoperation (Sham) oder Myokardinfarkt (MI). Die Behandlung der Tiere erfolgte beginnend am siebten postoperativen Tag über neun Wochen mit Placebo oder dem eNOS-Transkriptions-Modulator AVE9488. * $p < 0,05$ vs. Sham; ‡ $p < 0,05$ vs. MI Placebo

Nochmals veranschaulicht wird dieses Ergebnis mit Hilfe von Abb. 18, welche repräsentative Ausschnitte der drei Studiengruppen zeigt:

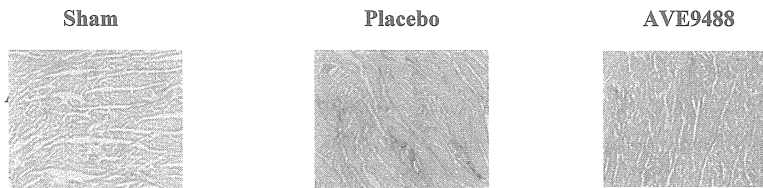


Abb. 18: Deutlich zu erkennen ist die erhebliche Zunahme der Fibrosierung auf dem mittleren Bild im Vergleich zur Abbildung links. Eine Reduzierung im Vergleich zu Placebo findet man dagegen in der Behandlungsgruppe, repräsentiert durch das rechte Bild.

4. Diskussion

4.1 Tiermodell der Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt

Die Verwendung von Tiermodellen der Herzinsuffizienz hat in der Vergangenheit wesentlich zum Verständnis der Pathomechanismen und zur Entwicklung therapeutischer Ansätze beigetragen (98-100). Es existieren zahlreiche solcher Tiermodelle, und da keines davon alle Anforderungen an ein ideales Modell erfüllen kann, ist es umso wichtiger, je nach Fragestellung das geeignete auszuwählen. Zu den am besten charakterisierten Modellen zählt der auch in der vorliegenden Arbeit durchgeführte experimentelle Myokardinfarkt bei Ratten (98,100). In Abhängigkeit von der Infarktgröße entwickeln diese Tiere einige Tage nach dem Infarkt eine linksventrikuläre Dysfunktion mit erhöhten Füllungsdrücken und erniedrigtem mittleren arteriellen Blutdruck, d. h. Zeichen einer Herzinsuffizienz (88). Darüber hinaus zeigen die infarzierten Ratten die eingangs beschriebenen und für die Progression der Herzinsuffizienz typischen Phänomene der neurohumoralen Aktivierung und des ventrikulären Remodelings (100-103). Aus diesen Gründen ergibt sich eine gute Vergleichbarkeit mit den sehr ähnlichen Prozessen am menschlichen Myokard; insbesondere wurde dieses Modell schon häufig für pharmakologische Studien verwendet (98,101). So konnten beispielsweise wertvolle Erkenntnisse über die Verwendung von ACE-Hemmern bei Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt gewonnen werden (104). Einschränkungen in der Übertragbarkeit der Ergebnisse ergeben sich allerdings aus verschiedenen Gründen, die u. a. in der Beschaffenheit des Rattenmyokards und im operativen Vorgehen liegen. So finden sich beispielsweise bei der Ratte eine ungefähr fünffache Herzfrequenz im Vergleich zum Menschen und ein kürzeres Aktionspotential ohne Plateauphase (98, 100). Zu bedenken ist auch, dass sich die chronische Herzinsuffizienz beim Menschen in der Regel über einen längeren Zeitraum entwickelt und meist mit chronischen Gefäßveränderungen (insbesondere Atherosklerose) bzw. Hypertonie vergesellschaftet ist, wohingegen im genannten Tiermodell ein plötzlicher Verschluss der kompletten linken Koronararterie bei ansonsten völlig gesunden Tieren induziert wird (98-100). Trotz dieser Unterschiede hat sich aus den oben angeführten Gründen der experimentelle Myokardinfarkt als sehr wertvolles Modell erwiesen, das die pathophysiologischen

Mechanismen der chronischen Herzinsuffizienz beim Menschen und deren therapeutische Beeinflussbarkeit in adäquater Weise abbildet (98,100,101,103).

Die Entwicklung einer Herzinsuffizienz bei Ratten ist vom Umfang des Infarkts abhängig (88). Aus diesem Grund wurden in die vorliegende Studie nur Tiere mit einer Infarktgröße über 40 Prozent eingeschlossen, da erst ab einem solchen Anteil infarzierten Myokards mit den Zeichen der linksventrikulären Dysfunktion zu rechnen ist (88, 98). Verschiedene Arbeiten belegen die Bedeutung der Infarktgröße als wesentlicher prognostischer Parameter (105,106). Die Ausdehnung des Myokardinfarkts ist dynamisch, d. h. der Verlust an vitalem Myokard ist in den ersten Stunden nach Koronarokklusion progredient (sog. Infarktextension). Die Ausdünnung und Dilatation der infarzierten Ventrikelwand (Infarktexpansion) findet in der frühen Postinfarktphase statt, parallel beginnt eine Neuordnung der Gewebearchitektur des überlebenden Myokards, welche auch über die Phase der Infarktexpansion hinaus anhält (11). Die Behandlung durch AVE9488 wurde sieben Tage nach dem Infarkt begonnen, zu diesem Zeitpunkt erreicht die Infarktexpansion bei der Ratte eine Plateauphase. Zudem ist bereits eine signifikante Kollagenablagerung im Infarktgebiet erfolgt (107). Auf diese Weise konnte eine Beeinflussung der Infarktgröße durch die Behandlung vermieden werden, was sich in den nahezu identischen Infarktgrößen beider Gruppen widerspiegelt.

4.2 Hämodynamik

Schon seit langem ist bekannt, dass es nach Myokardinfarkt zu einem Anstieg des linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDP) und zu einer Abnahme der maximalen Druckanstiegs- bzw. Druckabfallgeschwindigkeit (dP/dt_{\max} bzw. dP/dt_{\min}) kommt (108). Diese Veränderungen wurden auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet und deuten auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz hin. Der LVEDP ist ein Maß für die Compliance des linken Ventrikels (109). Ein Anstieg des LVEDP lässt sich bei systolischer ebenso wie bei diastolischer Dysfunktion beobachten (108), stützt die

Diagnose einer Herzinsuffizienz (110) und lässt Rückschlüsse auf die Effektivität der Behandlung zu (111). Durch die Therapie mit AVE9488 konnte in der vorliegenden Arbeit eine deutliche Reduzierung des LVEDP erreicht werden, was auf eine Verbesserung der linksventrikulären Dysfunktion durch das untersuchte Medikament hinweist. Die dP/dt_{\max} und die dP/dt_{\min} werden als Parameter für die Kontraktilität (112) bzw. für die Relaxationsfähigkeit (113) des Herzens angesehen. Unter Behandlung mit AVE9488 kam es zu einer deutlichen Zunahme beider Werte, was auf eine Besserung der kardialen Dysfunktion hindeutet. Der Aussagewert der Druckerhöhungsgeschwindigkeiten wird allerdings dadurch etwas eingeschränkt, dass sie auch durch die ventrikuläre Vor- und Nachlast beeinflusst werden (89,112).

Genauere Messungen sind über Druck-Volumen-Beziehungen möglich, was durch den Conductance-Katheter erfolgte. Druck-Volumen-Diagramme werden in der Kardiologie schon seit langem angewandt, letztlich verdanken sie ihre Bedeutung dem Wissen um die vermehrte Auswurfleistung des Herzens bei erhöhten Füllungsdrücken (Frank-Starling-Mechanismus) (114). Bei der Messung an insuffizienten Herzen beobachtet man gewöhnlich eine Rechtsverschiebung der Druck-Volumen-Kurven (115), was auch in dieser Studie der Fall war. Diese ist Ausdruck eines erhöhten enddiastolischen Volumens (LVEDV), d. h. einer Erhöhung der Vorlast. Die Gabe von AVE9488 beeinflusste auch diesen Parameter positiv und führte zu einer Verringerung des LVEDV. Schließlich war in Folge der Therapie auch eine Abnahme des linksventrikulären end-systolischen Volumens (LVESV) zu beobachten, was ebenfalls im Sinne einer verbesserten systolischen Herzfunktion interpretiert werden kann (116). Im Ganzen lässt sich also zusammenfassen, dass nach experimentellem Myokardinfarkt bei den Studientieren eine Veränderung zahlreicher hämodynamischer Parameter zu beobachten war. Diese weisen auf Dysfunktion und Remodeling des linken Ventrikels hin und konnten durch die Behandlung mit AVE9488 positiv beeinflusst werden.

4.3 Expression und Aktivität der eNOS

Wie bereits erwähnt, wurde der Einfluss von AVE9488 auf die eNOS-Transkription in einer Studie von Paulus et al. untersucht: Die Autoren fanden in Kulturen humaner Endothelzellen eine erhöhte eNOS-Transkription, außerdem zeigte sich durch die Behandlung mit diesem Medikament eine erhöhte vaskuläre eNOS-Expression in Mäusen mit ApoE-Defizienz (87). In der vorliegenden Studie wurden die Veränderungen von eNOS-Expression und -Aktivität durch AVE9488 weiter untersucht und charakterisiert. Im überlebenden Myokard des linken Ventrikels der Versuchstiere ergab sich eine Erhöhung der mRNA-Expression in der mit AVE9488 behandelten Gruppe. Gleichmaßen zeigte sich bei den behandelten Tieren eine erhöhte eNOS-Proteinexpression. Diese Ergebnisse legen nahe, dass AVE9488 nicht nur die vaskuläre, sondern auch die kardiale eNOS-Expression erhöht. Verschiedene Arbeiten deuten darauf hin, dass eine solche Erhöhung die linksventrikuläre Dysfunktion und das kardiale Remodeling positiv beeinflussen könnte: Janssens et al. zeigten 2004, dass eine Kardiomyozyten-spezifische Überexpression der eNOS die linksventrikuläre Funktion bei Mäusen nach experimentellem Myokardinfarkt verbessert und die kardiale Hypertrophie reduziert (117). Auch bei vaskulärer eNOS-Überexpression konnten eine verbesserte kardiale und pulmonale Funktion sowie eine höhere Überlebensrate bei herzinsuffizienten Mäusen nachgewiesen werden (118). Entsprechend ergab ein Tiermodell mit eNOS-defizienten Mäusen bei diesen eine höhere Mortalität, schlechtere hämodynamische Parameter und ein vermehrtes linksventrikuläres Remodeling nach Myokardinfarkt im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (119). Insgesamt sind diese Arbeiten ein sehr deutlicher Hinweis auf die protektive Rolle der eNOS im Rahmen des pathologischen Remodelings bei Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt. Aus dieser Erkenntnis ergibt sich, dass die eNOS ein wertvoller Angriffspunkt für eine pharmakologische Beeinflussung dieses Prozesses sein könnte. Sie liefert zugleich eine mögliche Erklärung für die beobachteten Effekte von AVE9488.

Des Weiteren wurde die NOS-Aktivität untersucht. Diese war nach Myokardinfarkt deutlich verringert und wurde durch die Behandlung mit AVE9488 annähernd normalisiert. Auch dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das untersuchte Medikament den

NO-Stoffwechsel beeinflusst und auf diese Weise seine kardioprotektive Wirkung entfaltet. Die Bestimmung der phosphorylierten eNOS lieferte dafür ein weiteres Indiz: Hierbei war eine Abnahme der Phosphorylierung nach Myokardinfarkt und eine weitgehende Normalisierung durch AVE9488 zu beobachten. Bei dieser Phosphorylierung handelt es sich um die Phosphorylierung am Serinrest 1177 (Ser¹¹⁷⁷), die zu einer eNOS-Aktivierung führt (69,70). Dass eine Erhöhung der eNOS-Aktivität und damit eine verstärkte NO-Bildung kardioprotektiv wirken, steht im Einklang mit bekannten Effekten: Klinische Studien mit Nitraten zeigten ebenfalls ein vermindertes linksventrikuläres Remodeling nach Myokardinfarkt (120); eine Vielzahl von Untersuchungen am menschlichen Herzen und im Tiermodell weisen zudem darauf hin, dass das insuffiziente Herz eine verminderte NO-Bioaktivität aufweist (121-124). Dies ist offenbar zumindest teilweise einer reduzierten Funktion der eNOS geschuldet (124).

Dennoch ist die Rolle der NO-Synthasen und von NO am Herzen seit vielen Jahren umstritten. Dies gilt sowohl für die Frage, ob es sich um protektive oder deletäre Faktoren in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz handelt als auch für die Bedeutung im Rahmen der kardialen Physiologie (124). Ebenso offen sind viele Fragen, die den Einfluss von NO auf Frequenz, Kontraktilität und β -adrenerge Stimulation des Herzens betreffen (61,125). Dass durch NO-Synthasen je nach Typ und subzellulärer Lokalisation auch gegensätzliche Effekte verursacht werden können (65), zeigt nicht nur, wie fein reguliert NO als Modulator der kardialen Funktion agiert, sondern kann auch als mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse bei der Untersuchung dieser Fragen dienen.

Lange Zeit wurde angenommen, dass eine gesteigerte NO-Produktion einen deletären Faktor im Rahmen des kardialen Remodelings darstellen könnte. Diese Hypothese stütze sich auf verschiedene Beobachtungen: So berichteten einige Arbeitsgruppen von einer NO-vermittelten Abnahme der Kontraktionskraft sowie der β -adrenergen Stimulation des Herzens (61,125); darüber hinaus beobachtete man, dass verschiedene Aktivatoren der iNOS im insuffizienten Herz vermehrt exprimiert sind (126,127). Mittlerweile wird aber verstärkt deutlich, dass dem NO eher eine protektive Rolle gegen das kardiale Remodeling zukommt (124), und dies gilt insbesondere für eNOS-generiertes

NO, dessen Bedeutung durch die genannten Arbeiten von Janssens et al., Jones et al. und Scherrer-Crosbie et al. (117-119) sehr viel klarer wurde. Zahlreiche weitere Publikationen weisen in eine ähnliche Richtung: Remodeling und Dysfunktion waren bei eNOS-defizienten Mäusen in einem Tiermodell mit chronischer Druckbelastung des linken Ventrikels sehr viel ausgeprägter (128). Darüber hinaus ließen sich die kardioprotektiven Effekte einer Statin-Behandlung nach experimentellem Myokardinfarkt (129) bei Mäusen mit dieser genetischen Veränderung nicht mehr nachweisen (130), analoge Ergebnisse fanden sich bei der Behandlung von eNOS-Knockout-Mäusen mit ACE-Hemmern oder Angiotensin-II-Rezeptorblockern (131). In einer weiteren Studie resultierte eine eNOS-Defizienz bei Mäusen in einer erhöhten Rate an kongenitalen Septumdefekten und Herzinsuffizienz (132).

Andererseits ist nicht geklärt, wie sich die eNOS-Expression nach Myokardinfarkt bzw. im Verlauf einer Herzinsuffizienz verändert; zu dieser Frage gibt es eine Reihe widersprüchlicher Veröffentlichungen, die sowohl von verminderter, unveränderter oder sogar erhöhter eNOS-Expression berichten (133). Bauersachs et al. fanden eine ausgeprägte endotheliale Dysfunktion bei Ratten nach Myokardinfarkt trotz erhöhter vaskulärer eNOS-Expression, zudem wurde eine gesteigerte Superoxid-Produktion bei diesen Tieren gemessen (134). Andere Arbeitsgruppen bestätigten, dass solche reaktiven Sauerstoffmetaboliten unter bestimmten Umständen Reaktionsprodukte eNOS-katalysierter Reaktionen sein können (84,135). Unter anderem durch oxidativen Stress kommt es zur Bildung von Peroxynitrit aus Superoxid und NO, die eNOS wird schließlich selbst zum Peroxynitrit-produzierenden Enzym (135). Die generierten Sauerstoffradikale verstärken linksventrikuläre Dysfunktion und pathologisches Remodeling (77-79). Dabei kommt es vermutlich auch zu einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO. Die normalerweise kardioprotektive Rolle der eNOS verändert sich somit unter diesen Voraussetzungen, die eNOS wird zu einer zusätzlichen Radikalquelle (84,135). Dieses Phänomen erklärt möglicherweise die unterschiedlichen Beobachtungen hinsichtlich der Rolle der eNOS. Im Einklang hiermit stehen Untersuchungen über den Einfluss von Aldosteron und dessen Antagonisten auf die eNOS-Expression: Im Tiermodell induziert Aldosteron oxidativen Stress und führt vermutlich zur eNOS-Entkopplung. Unter Behandlung mit einem Mineralkortikoid-Rezeptor-Antagonisten finden sich eine

verbesserte NO-Bioverfügbarkeit, eine verminderte Superoxid-Produktion und eine Normalisierung der eNOS-Phosphorylierung am Ser¹¹⁷⁷ (136). Insgesamt zeigen viele der genannten Publikationen die kardioprotektive Rolle von eNOS-generiertem NO (117-119,124,128,130-132) und dessen reduzierte Bioverfügbarkeit bei Herzinsuffizienz (121-124). Es lässt sich somit festhalten, dass die durch AVE9488 bewirkten Veränderungen in Bezug auf Expression, Aktivität und Phosphorylierung der eNOS gut vereinbar sind mit den positiven Effekten am erkrankten Herzen, die durch die Behandlung mit diesem Medikament erreicht werden konnten.

4.4 Ventrikuläre Morphologie und Hypertrophie

Nach Myokardinfarkt kommt es zu Veränderungen sowohl der links- als auch der rechtsventrikulären Morphologie. In Übereinstimmung mit früheren Publikationen (88, 102,137) wurde in der vorliegenden Arbeit eine Zunahme des Gewichts des rechten Ventrikels beobachtet. Diese rechtsventrikuläre Hypertrophie ging mit einer Erhöhung des linksventrikulären enddiastolischen Drucks einher. Die Behandlung mit AVE9488 reduzierte das Gewicht des rechten Ventrikels, was auch auf die verbesserte linksventrikuläre Funktion zurückzuführen sein dürfte. Eine signifikante Änderung des linksventrikulären Gewichts ergab sich nicht, obwohl ein großer Teil der linken Herzkammer durch Narbengewebe ersetzt war. Auch dieses Ergebnis steht im Einklang mit bisherigen Veröffentlichungen (88,101) und deutet auf eine Hypertrophie des überlebenden Myokards hin. Die Bedeutung von Hypertrophieprozessen im Rahmen der Herzinsuffizienz und des pathologischen Remodelings wird seit langem diskutiert. Nur teilweise verstanden sind bisher die Faktoren, die von der kardialen Hypertrophie als Anpassungsprozess zur dekompensierten Herzinsuffizienz führen (19,84). Von großer Bedeutung ist hierbei wohl die veränderte Genexpression in den Kardiomyozyten, d. h. die Induktion fetaler Genprogramme (14,84). Zu den veränderten Genen gehören u. a. die in der vorliegenden Studie untersuchten ANP und BNP (14,138-140). Deren Genexpression stieg nach Myokardinfarkt deutlich an, was durch die Therapie mit AVE9488 ebenfalls abgemildert werden konnte.

Im hypertrophierten, insuffizienten Ventrikel kommt es zu einer deutlich erhöhten Produktion der natriuretischen Peptide ANP und BNP (138,139), was auch in dieser Studie der Fall war. Darüber hinaus wird ihre Freisetzung durch Dehnung des Vorhof- und Ventrikelmyokards sowie durch Angiotensin II und Endothelin-1 stimuliert (138). Die Plasma-Konzentration der natriuretischen Peptide korreliert mit der Schwere der linksventrikulären Dysfunktion und steigt im Rahmen von Druck- und Volumenbelastungen an (138,139). ANP wird unter physiologischen Bedingungen besonders im Vorhof produziert; im Rahmen des Hypertrophieprozesses kommt es zu einer Zunahme der Konzentration im Ventrikel (139). BNP wird größtenteils im Ventrikel gebildet und ist mittlerweile als bedeutsamer prognostischer und diagnostischer Marker bei Herzinsuffizienz etabliert (140). Während ein Anstieg der mRNA-Konzentration von ANP bereits im Stadium der kompensierten Herzinsuffizienz mit hypertrophiertem Myokard erfolgt, nimmt die mRNA-Konzentration von BNP erst zu, wenn der LVEDP ebenfalls ansteigt (139). Die deutliche Reduzierung der ANP- und BNP-Konzentration im linken Ventrikel durch die Behandlung mit AVE9488 weist im Zusammenhang mit den Erkenntnissen über die veränderte Expression der natriuretischen Peptide im erkrankten Herzen ebenfalls auf eine positive Beeinflussung von ventrikulärer Hypertrophie und kardialen Remodeling durch das Medikament hin.

Der Einfluss von AVE9488 auf Prozesse der ventrikulären Hypertrophie steht im Einklang mit den beschriebenen Veränderungen von Expression und Aktivität der NO-Synthasen durch das Medikament: Eine antihypertrophe Wirkung von NO am Herzen wurde sowohl in verschiedenen Tiermodellen als auch an adulten kardialen Myozyten nachgewiesen (84). Bei eNOS-defizienten Mäusen zeigte sich eine verstärkte Hypertrophie sowohl nach Myokardinfarkt (119) als auch in Modellen mit chronischer Druckbelastung (128,141). In analoger Weise beobachteten Janssens et al. eine verminderte Hypertrophie bei Mäusen mit eNOS-Überexpression nach Myokardinfarkt (117). Nach Untersuchungen an Kardiomyozyten wurde zudem über eine antihypertrophe Wirkung von cGMP berichtet, einem wichtigen second messenger NO-vermittelter Effekte (84). Die bereits erwähnte Studie von Landmesser et al. zeigte einen verminderten antihypertrophen Effekt einer Statin-Behandlung bei eNOS-Knockout-Mäusen (130).

Im Rahmen der postischämischen Veränderungen am ventrikulären Myokard kommt vermutlich auch Endothelin-1 eine bedeutende Rolle zu (13,142). Dieses stieg in der vorliegenden Untersuchung bei den Placebo-behandelten Tieren nach Infarkt deutlich an und konnte durch die Therapie mit AVE9488 ebenfalls erheblich reduziert werden. Eine erhöhte Konzentration von Endothelin-1 ist ein bedeutender Faktor der myokardialen Hypertrophie, Dilatation und Fibrose (13,143), die Behandlung mit Endothelin-Antagonisten führte im Tierversuch zu verminderter Hypertrophie nach Myokardinfarkt (143) bzw. Aortenligatur (144) und zu reduzierter Expression fetaler Gene (144,145). Die Veränderungen im Endothelin-Stoffwechsel durch AVE9488 lassen sich möglicherweise auf Interaktionen zwischen dem NO- und Endothelin-Signalweg zurückführen, da NO die Expression und Produktion von Endothelin inhibiert (146, 147).

4.5 Linksventrikuläre Fibrosierung

Schließlich wurden in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen des Myokardinfarkts und der Behandlung mit AVE9488 auf die linksventrikuläre Fibrosierung untersucht. Die Kollagenvermehrung im vitalen Restmyokard nach Infarkt führt zu einer Versteifung des Ventrikels mit systolischer und diastolischer Funktionsstörung des Herzens (14,20) und ist mit Rhythmusstörungen verbunden (148), sie ist damit eine wesentliche Determinante des kardialen Remodelings nach Myokardinfarkt. In der Gruppe der Placebo-behandelten Tiere zeigte sich erwartungsgemäß ein erheblicher Anstieg der interstitiellen Fibrose. Diese Veränderung wurde durch die Behandlung mit AVE9488 signifikant reduziert. Eine mögliche Erklärung hierfür liefern die beobachteten Effekte des Medikaments auf den NO-Stoffwechsel: Verschiedene Untersuchungen zeigen eine erhöhte kardiale Fibrose bei eNOS-Knockout-Mäusen (128) bzw. eine reduzierte Produktion extrazellulärer Matrix unter NO-Einfluss (149). Darüber hinaus inhibiert NO auch die Kollagensynthese in glatten Muskelzellen (150). Landmesser et al. berichteten, dass bei eNOS-defizienten Mäusen im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen kein antifibrotischer Effekt von Atorvastatin mehr nachweisbar war (130); auch diese Arbeiten legen daher eine Beeinflussung der myokardialen Fibrose durch eNOS-

generiertes NO nahe. Untersuchungen von Tomita et al. zeigten unter NOS-Blockade neben einer gesteigerten Fibrosierung auch eine verstärkte Entzündungsreaktion mit Infiltration von Makrophagen und Myofibroblasten ins kardiale und vaskuläre Gewebe (151,152). Im Gegensatz dazu konnten Janssens et al. bei ihren bereits erwähnten Untersuchungen an Mäusen keinen Einfluss einer eNOS-Überexpression auf die myokardiale Fibrose feststellen (117). Insgesamt legen jedoch zahlreiche Veröffentlichungen (128, 130,149-152) eine wichtige Rolle von NO in der Regulation der Kollegen-Synthese und der Produktion extrazellulärer Matrix nahe. Auch die vorliegende Arbeit und die Beobachtungen bzgl. AVE9488 weisen in diese Richtung.

5. Zusammenfassung

Die Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt ist bestimmt durch neurohumorale Aktivierung und durch Umbauprozesse sowohl in der Infarktregion als auch im überlebenden Myokard, dem sog. ventrikulären Remodeling. Dieses ist charakterisiert durch Myokardhypertrophie, reaktive Fibrose und linksventrikuläre Dysfunktion und Dilatation. Welche Rolle hierbei einer verminderten Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) und einer veränderten Expression der NO-Synthasen (NOS) zukommt, ist Gegenstand intensiver Forschung. Man unterscheidet drei Isoformen der NO-Synthasen, wobei der eNOS im kardiovaskulären System vermutlich die größte Bedeutung zukommt. Das neu entwickelte Medikament AVE9488 steigert die eNOS-Transkription. Die vorliegende Arbeit sollte folgende Fragen beantworten: Kann durch die Behandlung mit AVE9488 eine Verbesserung von linksventrikulärem Remodeling und Dysfunktion nach Myokardinfarkt bei Ratten erzielt werden, und wie verändern sich eNOS-Expression und -Aktivität?

Männliche Wistar-Ratten wurden ab dem siebten Tag nach Koronarligatur oder Scheinoperation mit AVE9488 oder Placebo behandelt. Nach neun Wochen wurden hämodynamische Messungen durchgeführt und anschließend das Herz entnommen. Nach Myokardinfarkt fanden sich Zeichen einer ausgeprägten linksventrikulären Dysfunktion und charakteristische Veränderungen der linksventrikulären Morphologie im Sinne einer Hypertrophie und Fibrose. Darüber hinaus zeigte sich eine erhöhte Genexpression von ANP und BNP als Marker einer Herzinsuffizienz. Signifikant reduziert war hingegen die Expression der phosphorylierten und damit aktivierten Form der eNOS nach Myokardinfarkt, ebenso wurde eine verminderte NOS-Aktivität gemessen. Im Vergleich zur Placebo-Gruppe verbesserte die Behandlung mit AVE9488 zahlreiche Parameter der linksventrikulären Funktion, reduzierte das linksventrikuläre endsystolische ebenso wie das enddiastolische Volumen und verringerte die rechtsventrikuläre Hypertrophie. Des Weiteren fanden sich eine reduzierte ANP- und BNP-Expression sowie eine verminderte Kollagenmenge im linken Ventrikel. Insgesamt ließ sich somit eine deutliche Verbesserung von linksventrikulärem Remodeling und Dysfunktion feststellen. Die Behandlung mit AVE9488 erhöhte die Gen- und Proteinexpression der

eNOS. Zudem besserte sie die nach Myokardinfarkt reduzierte eNOS-Phosphorylierung und die NOS-Aktivität. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass AVE9488 durch Beeinflussung von Expression, Phosphorylierung und Aktivität der eNOS positive Effekte am erkrankten Herzen nach Myokardinfarkt hervorrufen kann. Dies steht im Einklang mit der in zahlreichen Arbeiten beschriebenen kardioprotektiven Wirkung von eNOS-generiertem NO.

6. Literaturverzeichnis

1. **Klein L, O'Connor CM, Gattis WA, Zampino M, de Luca L, Vitarelli A, Fedele F, Gheorghiadu M.** (2003)
Pharmacologic therapy for patients with chronic heart failure and reduced systolic function: review of trials and practical considerations.
Am J Cardiol 91:18F-40F
2. **Flather MD, Yusuf S, Kober L, Pfeffer M, Hall A, Murray G, Torp-Pedersen C, Ball S, Pogue J, Moye L, Braunwald E.** (2000)
Long-term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. ACE-Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group.
Lancet 355:1575-81
3. **Lechat P, Packer M, Chalon S, Cucherat M, Arab T, Boissel JP.** (1998)
Clinical effects of beta-adrenergic blockade in chronic heart failure: a meta-analysis of double-blind, placebo-controlled, randomized trials.
Circulation 98:1184-91
4. **Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J.** (1999)
The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators
N Engl J Med 341:709-17
5. **Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M.** (2003)
Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction
N Engl J Med 348:1309-21
6. **Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KK, Murabito JM, Vasan RS.** (2002)
Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure.
N Engl J Med 347:1397-402
7. **Guyatt GH, Devereaux PJ.** (2004)
A review of heart failure treatment.
Mt Sinai J Med 71:47-54
8. **Thom TJ, Epstein FH.** (1994)
Heart disease, cancer, and stroke mortality trends and their interrelations. An international perspective.
Circulation 90:574-82.

9. **Murray-Thomas T, Cowie MR.** (2003)
Epidemiology and clinical aspects of congestive heart failure.
J Renin Angiotensin Aldosterone Syst 4:131-6
10. **Malek M.** (1999)
Health economics of heart failure.
Heart 82:IV11-3.
11. **Pfeffer MA, Braunwald E.** (1990)
Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications.
Circulation 81:1161-1172
12. **Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ.** (2001)
Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure?
Circ Res 89:201-10.
13. **Sutton MG, Sharpe N.** (2000)
Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy.
Circulation 101:2981-88.
14. **Braunwald E, Bristow MR.** (2000)
Congestive heart failure: fifty years of progress.
Circulation 102: IV14-23
15. **Beltrami CA, Finato N, Rocco M, Feruglio GA, Puricelli C, Cigola E, Quaini F, Sonnenblick EH, Olivetti G, Anversa P.** (1994)
Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans.
Circulation 89:151-63
16. **Eichhorn EJ, Bristow MR.** (1996)
Medical therapy can improve the biological properties of the chronically failing heart. A new era in the treatment of heart failure.
Circulation 94:2285-96.
17. **Gottlieb SS.** (2003)
The Neurohormonal Paradigm – Have We Gone Too Far?
J Am Coll Cardiol 41:1458-9
18. **Sadoshima J, Izumo S.** (1997)
The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress.
Annu Rev Physiol 59:551-71.
19. **Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA.** (2004)
Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target?
Circulation 109:1580-9.

-
20. **Weber KT.** (1997)
Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation.
Circulation 96:4065-82
 21. **Volders PG, Willems IE, Cleutjens JP, Arends JW, Havenith MG, Daemen MJ.** (1993)
Interstitial collagen is increased in the non-infarcted human myocardium after myocardial infarction.
J Mol Cell Cardiol 25:1317-23
 22. **Brilla CG, Rupp H, Funck R, Maisch B.** (1995)
The renin-angiotensin-aldosterone system and myocardial collagen matrix remodelling in congestive heart failure.
Eur Heart J 1995 Dec;16 Suppl O:107-9.
 23. **Delcayre C, Swynghedauw B.** (2002)
Molecular mechanisms of myocardial remodeling. The role of aldosterone.
J Mol Cell Cardiol 34:1577-84
 24. **Silvestre JS, Heymes C, Oubenaissa A, Robert V, Aupetit-Faisant B, Carayon A, Swynghedauw B, Delcayre C.** (1999)
Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis.
Circulation 99:2694-701
 25. **Milanez MC, Gomes MG, Vassallo DV, Mill JG.** (1997)
Effects of captopril on interstitial collagen in the myocardium after infarction in rats.
J Card Fail 3:189-97.
 26. **Fracarollo D, Galuppo P, Hildemann S, Christ M, Ertl G, Bauersachs J.** (2003)
Additive improvement of left ventricular remodeling and neurohormonal activation by aldosterone receptor blockade with eplerenone and ACE inhibition in rats with myocardial infarction.
J Am Coll Cardiol 42:1666-73
 27. **Brilla CG, Funck RC, Rupp H.** (2000)
Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis in patients with hypertensive heart disease
Circulation 102:1388-93.
 28. **Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A, Pitt B.** (2000)
Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on myocardial fibrosis and function in hypertrophied and failing myocardium from the spontaneously hypertensive rat.
Circulation 102:2700-6

-
29. **Seeland U, Kouchi I, Zolk O, Itter G, Linz W, Bohm M.** (2002)
Effect of ramipril and furosemide treatment on interstitial remodeling in post-infarction heart failure rat hearts.
J Mol Cell Cardiol 34:151-63.
 30. **Jugdutt BI.** (2003)
Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough?
Circulation 108:1395-403.
 31. **Neubauer S, Horn M, Cramer M, Harre K, Newell JB, Peters W, Pabst T, Ertl G, Hahn D, Ingwall JS, Kochsiek K.** (1997)
Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy.
Circulation 96:2190-6.
 32. **Ingwall JS, Weiss RG.** (2004)
Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function.
Circ Res 95:135-45
 33. **Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V.** (2004)
Energy metabolism in heart failure.
J Physiol 555:1-13
 34. **van Bilsen M, Smeets PJ, Gilde AJ, van der Vusse GJ.** (2004)
Metabolic remodelling of the failing heart: the cardiac burn-out syndrome?
Cardiovasc Res 61:218-26
 35. **Ungerer M, Bohm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse MJ.** (1993)
Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart.
Circulation 87:454-63
 36. **Bristow MR.** (1993)
Changes in myocardial and vascular receptors in heart failure.
Am Coll Cardiol. 22(4 Suppl A):61A-71A.
 37. **Schaper J, Froede R, Hein S, Buck A, Hashizume H, Speiser B, Friedl A, Bleese N.** (1991)
Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy.
Circulation 83:504-14.
 38. **Hein S, Kostin S, Heling A, Maeno Y, Schaper J.** (2000)
The role of the cytoskeleton in heart failure.
Cardiovasc Res. 45:273-8.

-
39. **Katz AM.** (2000)
Cytoskeletal abnormalities in the failing heart: out on a LIM?
Circulation 101:2672-3.
 40. **Sabbah HN.** (2000)
Apoptotic cell death in heart failure.
Cardiovasc Res 45:704-12.
 41. **Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA.** (1996)
Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure:
N Engl J Med 335:1182-9.
 42. **Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG.** (2001)
Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition.
Biochem J 357:593-615.
 43. **Knowles RG, Moncada S.** (1994)
Nitric oxide synthases in mammals.
Biochem J 298:249-58.
 44. **Furchgott RF, Zawadzki JV.** (1980)
The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.
Nature 288:373-6.
 45. **Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G.** (1987)
Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.
Proc Natl Acad Sci U S A 84:9265-9.
 46. **Furchgott RF.** (1988)
Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In *Vasodilation, Vanhouette PM, ed.: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endothelium*
Raven Press New York: 401-14
 47. **Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S.** (1987)
Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.
Nature 327:524-6.
 48. **Palmer RM, Ashton DS, Moncada S.** (1988)
Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine.
Nature 333:664-6.

-
49. **Mayer B, Schmidt K, Humbert P, Bohme E.** (1989)
Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca^{2+} -dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase.
Biochem Biophys Res Commun 164:678-85.
50. **Mulsch A, Bassenge E, Busse R.** (1989)
Nitric oxide synthesis in endothelial cytosol: evidence for a calcium-dependent and a calcium-independent mechanism.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 340:767-70.
51. **Bredt DS, Snyder SH.** (1990)
Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme.
Proc Natl Acad Sci U S A 87:682-5.
52. **Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH.** (1991)
Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase.
Nature 351:714-8.
53. **Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F.** (1991)
Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells.
Proc Natl Acad Sci U S A 88:10480-4.
54. **Yui Y, Hattori R, Kosuga K, Eizawa H, Hiki K, Kawai C.** (1991)
Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages.
J Biol Chem 266:12544-7.
55. **Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF.** (1991)
Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein.
Proc Natl Acad Sci U S A 88:7773-7.
56. **Geller DA, Billiar TR.** (1998)
Molecular biology of nitric oxide synthases.
Cancer Metastasis Rev 17:7-23.
57. **Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel TM.** (2006)
The Regulation and Pharmacology of Endothelial Nitric Oxide Synthases.
Annu Rev Pharmacol Toxicol 46:235-76
58. **Schulz R, Rassaf T, Massion PB, Kelm M, Balligand JL.** (2005)
Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis.
Pharmacol Ther 108:225-56

-
59. **Mungrue IN, Husain M, Stewart DJ.** (2002)
The role of NOS in heart failure: lessons from murine genetic models.
Heart Fail Rev 7:407-22.
60. **Gorren AC, Mayer B.** (1998)
The versatile and complex enzymology of nitric oxide synthase.
Biochemistry (Mosc) 63:734-43.
61. **Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL.** (2003)
Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing.
Circ Res 93:388-98.
62. **Ignarro LJ, Buga GM, Wei LH, Bauer PM, Wu G, del Soldato P.** (2001)
Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation.
Proc Natl Acad Sci U S A 98:4202-8.
63. **Kojda G, Kottenberg K.** (1999)
Regulation of basal myocardial function by NO.
Cardiovasc Res 41:514-23.
64. **Ziolo MT, Bers DM.** (2003)
The Real Estate of NOS Signaling: Location, Location, Location.
Circ Res 92:1279-81.
65. **Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodriguez ER, Huang PL, Lima JA, Berkowitz DE, Hare JM.** (2002)
Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms.
Nature 416:337-9.
66. **Garcia-Cardena G, Oh P, Liu J, Schnitzer JE, Sessa WC.** (1996)
Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling.
Proc Natl Acad Sci U S A 93:6448-53.
67. **Feron O, Kelly RA.** (2001)
The caveolar paradox: suppressing, inducing, and terminating eNOS signaling.
Circ Res 88:129-31.
68. **Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T.** (1997)
Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin.
J Biol Chem 272:15583-6.

-
69. **Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM.** (1999)
Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation.
Nature 399:601-5.
70. **Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC.** (1999)
Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt.
Nature 399:597-601.
71. **Michell BJ, Chen Zp, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, Sim AT, Kemp BE.** (2001)
Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase.
J Biol Chem 276:17625-8
72. **Michell BJ, Harris MB, Chen ZP, Ju H, Venema VJ, Blackstone MA, Huang W, Venema RC, Kemp BE.** (2002)
Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635.
J Biol Chem 277:42344-51
73. **Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R.** (2001)
Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity.
Circ Res 88:E68-75.
74. **Kou R, Greif D, Michel T.** (2002)
Dephosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase by vascular endothelial growth factor. Implications for the vascular responses to cyclosporin A.
J Biol Chem 277:29669-73
75. **Berka V, Wu G, Yeh HC, Palmer G, Tsai AL.** (2004)
Three different oxygen-induced radical species in endothelial nitric-oxide synthase oxygenase domain under regulation by L-arginine and tetrahydrobiopterin.
J Biol Chem 279:32243-51
76. **Takimoto E, Champion HC, Li M, Ren S, Rodriguez ER, Tavazzi B, Lazzarino G, Paolucci N, Gabrielson KL, Wang Y, Kass DA.** (2005)
Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load.
J Clin Invest 115:1221-31.

-
77. **Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS.** (2002)
Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure.
J Mol Cell Cardiol 34:379-88.
 78. **Sorescu D, Griendling KK.** (2002)
Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure.
Congest Heart Fail 8:132-40.
 79. **Takano H, Zou Y, Hasegawa H, Akazawa H, Nagai T, Komuro I.** (2003)
Oxidative stress-induced signal transduction pathways in cardiac myocytes: involvement of ROS in heart diseases.
Antioxid Redox Signal 5:789-94.
 80. **Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S.** (2003)
Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase.
J Biol Chem 278:22546-54.
 81. **Stuehr D, Pou S, Rosen GM.** (2001)
Oxygen reduction by nitric-oxide synthases.
J Biol Chem 276:14533-6
 82. **Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG.** (2003)
Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension.
J Clin Invest 111:1201-9.
 83. **Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL.** (1996)
Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury.
Proc Natl Acad Sci U S A 93:6770-4.
 84. **Wollert KC, Drexler H.** (2002)
Regulation of cardiac remodeling by nitric oxide: focus on cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis.
Heart Fail Rev 7:317-25.
 85. **Bauersachs J, Schäfer A.** (2004)
Endothelial dysfunction in heart failure: mechanisms and therapeutic approaches.
Curr Vasc Pharmacol 2:115-24.
 86. **Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F.** (2001)
NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction.
Med Sci Monit 7:801-19.

-
87. **Paulus W, Strobel H, Li H, Suzuki T, Dharanipragada R, Tiemann M, Margerie D, Busch A, Foerstermann U, Ruetten H.**
A novel endothelial nitric oxide synthase transcription enhancer suppresses atherosclerosis in apoE-deficient mice.
(submitted)
88. **Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E.** (1979)
Myocardial infarct size and ventricular function in rats.
Circ Res 44:503-12
89. **Baan J, van der Velde ET, de Bruin HG, Smeenk GJ, Koops J, van Dijk AD, Temmerman D, Senden J, Buis B.** (1984)
Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter.
Circulation 70:812-23
90. **Ito H, Takaki M, Yamaguchi H, Tachibana H, Suga H.** (1996)
Left ventricular volumetric conductance catheter for rats.
Am J Physiol 270:H1509-14.
91. **Chomczynski P, Sacchi N.** (1987)
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.
Anal Biochem 162:156-9.
92. **Kawasaki ES.** (1990)
Amplification of RNA. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. PCR protocols: A guide to methods and applications. San Diego (CA) Academic Press: 21-27.
93. **Cohen SN, Chang AC, Hsu L.** (1972)
Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA.
Proc Natl Acad Sci USA 69:2110-4
94. **Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R.** (1992)
Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences.
Biotechnology 10:413-7.
95. **Bradford MM.** (1976)
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal Biochem 72:248-54.
96. **Whittaker P, Boughner DR, Kloner RA.** (1991)
Role of collagen in acute myocardial infarct expansion.
Circulation 84:2123-34.

-
97. **Tsikakos D, Sandmann J, Savva A, Luessen P, Boger RH, Gutzki FM, Mayer B, Frolich JC.** (2000)
Assessment of nitric oxide synthase activity in vitro and in vivo by gas chromatography-mass spectrometry.
J Chromatogr B Biomed Sci Appl 742:143-53.
98. **Muders F, Elsner D.** (2000)
Animal models of chronic heart failure.
Pharmacol Res 41:605-12.
99. **Doggrell SA, Brown L.** (1998)
Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure.
Cardiovasc Res 39:89-105.
100. **Hasenfuss G.** (1998)
Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy.
Cardiovasc Res 39:60-76.
101. **Gaballa MA, Goldman S.** (2002)
Ventricular remodeling in heart failure.
J Card Fail 8:S476-85.
102. **Litwin SE, Katz SE, Morgan JP, Douglas PS.** (1994)
Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat.
Circulation 89:345-54.
103. **Hodsman GP, Kohzuki M, Howes LG, Sumithran E, Tsunoda K, Johnston CI.** (1988)
Neurohumoral responses to chronic myocardial infarction in rats.
Circulation 78:376-81.
104. **Solomon SD, Pfeffer MA.** (2003)
Aldosterone antagonism and myocardial infarction: from animals to man and back.
J Am Coll Cardiol 42:1674-6.
105. **McKay RG, Pfeffer MA, Pasternak RC, Markis JE, Come PC, Nakao S, Alderman JD, Ferguson JJ, Safian RD, Grossman W.** (1986)
Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion.
Circulation 74:693-702.
106. **Ertl G, Frantz S.** (2005)
Healing after myocardial infarction.
Cardiovasc Res 66:22-32.

-
107. **Mannisi JA, Weisman HF, Bush DE, Dudeck P, Healy B.** (1987)
Steroid administration after myocardial infarction promotes early infarct expansion. A study in the rat.
J Clin Invest 79:1431-9.
108. **Braunwald E, Zipes DP, Libby P.** (2001)
Heart Disease
6th Edition, WB:Saunders Company 2001
109. **Kern MJ, Christopher T.** (1998)
Hemodynamic rounds series II: the LVEDP.
Cathet Cardiovasc Diagn 44:70-4.
110. **Sharma GV, Woods PA, Lambrew CT, Berg CM, Pietro DA, Rocco TP, Welt FW, Sacchetti P, McIntyre KM.** (2002)
Evaluation of a noninvasive system for determining left ventricular filling pressure.
Arch Intern Med 162:2084-8.
111. **Prunier F, Gaertner R, Louedec L, Michel JB, Mercadier JJ, Escoubet B.** (2002)
Doppler echocardiographic estimation of left ventricular end-diastolic pressure after MI in rats.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 283:346-52.
112. **Mason DT.** (1969)
Usefulness and limitations of the rate of rise of intraventricular pressure (dp-dt) in the evaluation of myocardial contractility in man.
Am J Cardiol 23:516-27.
113. **Serizawa T, Vogel WM, Apstein CS, Grossman W.** (1981)
Comparison of acute alterations in left ventricular relaxation and diastolic chamber stiffness induced by hypoxia and ischemia. Role of myocardial oxygen supply-demand imbalance.
J Clin Invest 68:91-102.
114. **Burkhoff D, Mirsky I, Suga H.** (2005)
Assessment of systolic and diastolic ventricular properties via pressure-volume analysis: a guide for clinical, translational, and basic researchers.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 289:501-12.
115. **Hasnat AK, van der Velde ET, Hon JK, Yacoub MH.** (2003)
Reproducible model of post-infarction left ventricular dysfunction: haemodynamic characterization by conductance catheter.
Eur J Cardiothorac Surg 24:98-104.

-
116. **Tulner SA, Klautz RJ, van Rijk-Zwikker GL, Engbers FH, Bax JJ, Baan J, van der Wall EE, Dion RA, Steendijk P.** (2003)
Perioperative assessment of left ventricular function by pressure-volume loops using the conductance catheter method.
Anesth Analg 97:950-7.
117. **Janssens S, Pokreisz P, Schoonjans L, Pellens M, Vermeersch P, Tjwa M, Jans P, Scherrer-Crosbie M, Picard MH, Szelid Z, Gillijns H, Van de Werf F, Collen D, Bloch KD.** (2004)
Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 improves left ventricular performance and reduces compensatory hypertrophy after myocardial infarction.
Circ Res 94:1256-62.
118. **Jones SP, Greer JJ, van Haperen R, Duncker DJ, de Crom R, Lefer DJ.** (2003)
Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates congestive heart failure in mice.
Proc Natl Acad Sci U S A 100:4891-6.
119. **Scherrer-Crosbie M, Ullrich R, Bloch KD, Nakajima H, Nasseri B, Aretz HT, Lindsey ML, Vancon AC, Huang PL, Lee RT, Zapol WM, Picard MH.** (2001)
Endothelial nitric oxide synthase limits left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice.
Circulation 104:1286-91.
120. **Mahmorian JJ, Moye LA, Chinoy DA, Sequeira RF, Habib GB, Henry WJ, Jain A, Chaitman BR, Weng CS, Morales-Ballejo H, Pratt CM.** (1998)
Transdermal nitroglycerin patch therapy improves left ventricular function and prevents remodeling after acute myocardial infarction: results of a multicenter prospective randomized, double-blind, placebo-controlled trial.
Circulation 97:2017-24.
121. **Recchia FA, McConnell PI, Bernstein RD, Vogel TR, Xu X, Hintze TH.** (1998)
Reduced nitric oxide production and altered myocardial metabolism during the decompensation of pacing-induced heart failure in the conscious dog.
Circ Res 83:969-79.
122. **Mohri M, Egashira K, Tagawa T, Kuga T, Tagawa H, Harasawa Y, Shimokawa H, Takeshita A.** (1997)
Basal release of nitric oxide is decreased in the coronary circulation in patients with heart failure.
Hypertension 30:50-6.

-
123. **Smith CJ, Sun D, Hoegler C, Roth BS, Zhang XP, Zhao G, Xu X-B, Kobari Y, Pritchard K Jr, Sessa WC, Hintze TH.** (1996)
Reduced gene expression of vascular endothelial NO synthase and cyclooxygenase-1 in heart failure.
Circ Res 78:58–64.
124. **Prabhu SD.** (2004)
Nitric oxide protects against pathological ventricular remodeling: reconsideration of the role of NO in the failing heart.
Circ Res 94:1155-7.
125. **Hare JM.** (2003)
Nitric oxide and excitation-contraction coupling.
J Mol Cell Cardiol 35:719-29.
126. **Prabhu SD, Chandrasekar B, Murray DR, Freeman GL.** (2000)
Beta-adrenergic blockade in developing heart failure: effects on myocardial inflammatory cytokines, nitric oxide, and remodeling.
Circulation 101:2103-9.
127. **Satoh M, Nakamura M, Tamura G, Makita S, Segawa I, Tashiro A, Satodate R, Hiramori K.** (1997)
Inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha in myocardium in human dilated cardiomyopathy.
J Am Coll Cardiol 29:716-24.
128. **Ichinose F, Bloch KD, Wu JC, Hataishi R, Aretz HT, Picard MH, Scherrer-Crosbie M.** (2004)
Pressure overload-induced LV hypertrophy and dysfunction in mice are exacerbated by congenital NOS3 deficiency.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 286:1070-5
129. **Bauersachs J, Galuppo P, Fraccarollo D, Christ M, Ertl G.** (2001)
Improvement of left ventricular remodeling and function by hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibition with cerivastatin in rats with heart failure after myocardial infarction.
Circulation 104:982-5.
130. **Landmesser U, Engberding N, Bahlmann FH, Schaefer A, Wiencke A, Heineke A, Spiekermann S, Hilfiker-Kleiner D, Templin C, Kotlarz D, Mueller M, Fuchs M, Hornig B, Haller H, Drexler H.** (2004)
Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase.
Circulation 110:1933-9.

-
131. **Liu YH, Xu J, Yang XP, Yang F, Shesely E, Carretero OA.** (2002)
Effect of ACE inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists on endothelial NO synthase knockout mice with heart failure.
Hypertension 39:375-81.
132. **Feng Q, Song W, Lu X, Hamilton JA, Lei M, Peng T, Yee SP.** (2002)
Development of heart failure and congenital septal defects in mice lacking endothelial nitric oxide synthase.
Circulation 106:873-9.
133. **Munzel T, Harrison DG.** (1999)
Increased superoxide in heart failure: a biochemical baroreflex gone awry.
Circulation 100:216-8.
134. **Bauersachs J, Bouloumie A, Fraccarollo D, Hu K, Busse R, Ertl G.** (1999)
Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production.
Circulation 100:292-8.
135. **Forstermann U, Munzel T.** (2006)
Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace.
Circulation 113:1708-14.
136. **Bauersachs J, Fraccarollo D.** (2006)
Endothelial NO synthase target of aldosterone.
Hypertension 48:27-8.
137. **Litwin SE, Raya TE, Anderson PG, Litwin CM, Bressler R, Goldman S.** (1991)
Induction of myocardial hypertrophy after coronary ligation in rats decreases ventricular dilatation and improves systolic function.
Circulation 84:1819-27.
138. **Levin ER, Gardner DG, Samson WK.** (1998)
Natriuretic peptides.
N Engl J Med 339:321-8.
139. **Vanderheyden M, Bartunek J, Goethals M.** (2004)
Brain and other natriuretic peptides: molecular aspects.
Eur J Heart Fail 6:261-8.
140. **Maisel A.** (2002)
B-type natriuretic peptide levels: diagnostic and prognostic in congestive heart failure: what's next?
Circulation 105:2328-31.

-
141. **Ruetten H, Dimmeler S, Gehring D, Ihling C, Zeiher AM.** (2005)
Concentric left ventricular remodeling in endothelial nitric oxide synthase knockout mice by chronic pressure overload.
Cardiovasc Res 66:444-53.
142. **Wei CM, Lerman A, Rodeheffer RJ, McGregor CG, Brandt RR, Wright S, Heublein DM, Kao PC, Edwards WD, Burnett JC Jr.** (1994)
Endothelin in human congestive heart failure.
Circulation 89:1580-6.
143. **Mulder P, Richard V, Derumeaux G, Hogie M, Henry JP, Lallemand F, Compagnon P, Mace B, Comoy E, Letac B, Thuillez C.** (1997)
Role of endogenous endothelin in chronic heart failure: effect of long-term treatment with an endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling.
Circulation 96:1976-82.
144. **Ito H, Hiroe M, Hirata Y, Fujisaki H, Adachi S, Akimoto H, Ohta Y, Marumo F.** (1994)
Endothelin ETA receptor antagonist blocks cardiac hypertrophy provoked by hemodynamic overload.
Circulation 89:2198-203.
145. **Fracarollo D, Bauersachs J, Kellner M, Galuppo P, Ertl G.** (2002)
Cardioprotection by long-term ET(A) receptor blockade and ACE inhibition in rats with congestive heart failure: mono- versus combination therapy.
Cardiovasc Res 54:85-94.
146. **Vanhoutte PM.** (2000)
Say NO to ET.
J Auton Nerv Syst 81:271-7.
147. **Warner TD.** (1999)
Relationships between the endothelin and nitric oxide pathways.
Clin Exp Pharmacol Physiol 26:247-52.
148. **Swynghedauw B.** (1999)
Molecular mechanisms of myocardial remodeling.
Physiol Rev 79:215-62.
149. **Kim NN, Villegas S, Summerour SR, Villarreal FJ.** (1999)
Regulation of cardiac fibroblast extracellular matrix production by bradykinin and nitric oxide.
J Mol Cell Cardiol 31:457-66.

-
150. **Kolpakov V, Gordon D, Kulik TJ.** (1995)
Nitric oxide-generating compounds inhibit total protein and collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells.
Circ Res 76:305-9.
151. **Tomita H, Egashira K, Ohara Y, Takemoto M, Koyanagi M, Katoh M, Yamamoto H, Tamaki K, Shimokawa H, Takeshita A.** (1998)
Early induction of transforming growth factor-beta via angiotensin II type 1 receptors contributes to cardiac fibrosis induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats.
Hypertension 32:273-9.
152. **Tomita H, Egashira K, Kubo-Inoue M, Usui M, Koyanagi M, Shimokawa H, Takeya M, Yoshimura T, Takeshita A.** (1998)
Inhibition of NO synthesis induces inflammatory changes and monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat hearts and vessels.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 18:1456-64.

Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. Johann Bauersachs danke ich herzlich für die Möglichkeit zur Bearbeitung des Themas und für die ausgezeichnete wissenschaftliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Daniela Fraccarollo und Herrn Dr. Paolo Galuppo, ohne deren Anleitung, Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei den Experimenten wie auch bei der statistischen Auswertung die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ebenso danke ich ihnen für die Durchsicht meiner Arbeit und die vielen Hinweise, die zur Vollendung derselben notwendig waren.

Frau Meike Leutke danke ich für die technische Unterstützung der Experimente.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mir das Studium und die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name:	Hoffmann, Michael Alfred
Geburtsdatum:	19. Januar 1979
Geburtsort:	Marktheidenfeld
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Vater:	Hoffmann, Paul
Mutter:	Hoffmann, Monika (geb. Labisch)

Schulischer Werdegang

1985-1989	Grundschule der Stadt Bad Königshofen
1989-1998	Gymnasium Bad Königshofen
1998	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1998/1999	Zivildienst „Mobiler Sozialer Hilfsdienst“, St. Laurentius, Bad Neustadt
-----------	---

Universitärer Werdegang

1999-2006	Studium der Medizin an der Julius- Maximilians-Universität in Würzburg
08/2001	Ärztliche Vorprüfung
08/2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2006	Approbation als Arzt

Michael Hoffmann

