

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

**Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl**

**Pharmakologische Postkonditionierung mit dem Sphingosin-1-  
Phosphat- Rezeptoragonisten FTY 720 nach myokardialer Ischämie/  
Reperfusion**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Franziska Walter**

**aus Würzburg**

**Würzburg, September 2009**

# **Referenten**

**Referent: Priv.-Doz. Dr. A. Bonz**

**Koreferent: Prof. Dr. G. Ertl**

**Dekan: Prof. Dr. M. Frosch**

**Mündlicher Prüfer: Prof. Dr. K. N. Klotz**

**Tag der mündlichen Prüfung**

**12. März 2010**

**Die Promovendin ist Ärztin**

Meiner Familie in Liebe gewidmet



# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung

- 1.1. Postkonditionierung
- 1.2. Sphingosin-1-Phosphat
- 1.3. FTY 720= Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoragonist
- 1.4. Bedeutung von Sphingosin-1-Phosphat auf  
Ischämie/ Reperfusion
- 1.5. Fragestellung zum Thema meiner Doktorarbeit

## 2. Material und Methoden

- 2.1. Tiere und Tierhaltung
- 2.2. Arbeitsvorgang
- 2.3. Gewebeaufbereitung
- 2.4. Bewertung der „area at risk“ und der Infarktgröße
- 2.5. Differenzial-Blutbild
- 2.6. Herstellung von Gefrierschnitten
- 2.7. Immunhistologie auf Gefrierschnittpräparaten
- 2.8. Gewinnung von Gewebe, Proteinbestimmung nach  
Bradford, Caspase 3 Aktivität
- 2.9. Caspase 3 Aktivität
- 2.10. Auswertung der Caspase 3 Aktivität
- 2.11. Enzym linked Immuno Sorbent Assay- ELISA
- 2.12. TNF- alpha Bestimmung im Serum und in der  
Infarktborderzone
- 2.13. Statistische Analyse

3. Ergebnisse
  - 3.1. Überleben der Tiere
  - 3.2. Infarktgröße
  - 3.3. Lymphopenie durch FTY 720 im peripheren Blut
  - 3.4. Myokardiale Caspase 3 Aktivität
  - 3.5. Granulozyteninfiltration in der Infarkt Borderzone
  - 3.6. TNF- alpha Konzentration im Infarkt und im Serum
4. Diskussion
5. Zusammenfassung
6. Literaturverzeichnis
7. Danksagung

# **1. Einleitung**

Der Herzinfarkt als akute und lebensbedrohliche Erkrankung entsteht durch einen Verschluss von Herzkranzgefäßen und hat einen irreversiblen Schaden des Myokards aufgrund einer Ischämie zur Folge. In Deutschland erleiden jährlich etwa 300.000 Menschen einen Herzinfarkt [1].

Aufgrund dieser Tatsache ist es von großem allgemeinem Interesse ein therapeutisches Konzept zur Infarktgrößenreduktion zu finden.

In meiner Doktorarbeit habe ich daher das therapeutische Potential einer pharmakologischen Postkonditionierung mittels des Sphingosin-1-Phosphat- Rezeptoragonisten FTY 720 in vivo am Rattenmodell untersucht.

## **1.1. Postkonditionierung**

Postkonditionierung stellt ein Phänomen dar, in dem kurze Phasen der Unterbrechung der Blutzufuhr in einem Organ während der frühen Phase der Reperfusion vorgenommen werden. Diese Maßnahme wird daher auch als ischämische Postkonditionierung bezeichnet. Kürzlich wurde in Studien gezeigt, dass das jeweilige Organ vor einer Schädigung durch Ischämie/ Reperfusion geschützt wird, wenn eine solche transiente Unterbrechung der Blutzufuhr unmittelbar vor Beginn der Reperfusion vorgenommen wurde [2], [3], [4]. In renalen Ischämie/ Reperfusionsmodellen wurde bereits festgestellt, dass ischämische Postkonditionierung die Apoptose in renalen Ischämie/ Reperfusionsmodellen bei Ratten verringert und die renale Funktion verbessert [2]. Somit wirkt sich eine Postkonditionierung günstig auf das infarzierte Gewebe aus.

Analog zur ischämischen Postkonditionierung wird bei der ischämischen Präkonditionierung eine kurzzeitige Ischämie induziert, bevor eine über eine längere Zeit andauernde Unterbrechung der Blutzufuhr in einem

Organ durchgeführt wird. Beim Vergleich des kardioprotektiven Effekts der Postkonditionierung mit dem des klassischen Konzepts der ischämischen Präkonditionierung erwiesen sich die beiden Methoden im Myokardgewebe als gleichermaßen effektiv [5].

Pharmakologische Interventionen, als sogenannte pharmakologische Postkonditionierung, bei dem das jeweilige Pharmakon vor Reperfusion appliziert wird, könnten ähnliche günstige Effekte erzeugen [7].

In diesem Zusammenhang wurde die pharmakologische Postkonditionierung anhand eines Sphingosin-1-Phosphat-1-Rezeptoragonisten SEW 2871 (kurz: S1P1-Agonisten) ex vivo untersucht. Bei dem unter Reperfusion appliziertem S1P1-Agonisten SEW 2871 wurde kein kardioprotektiver Effekt festgestellt [6]. Jedoch konnte bei der Testung von einem weiteren Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoragonisten, FTY 720, im Sinne der pharmakologischen Postkonditionierung am humanen Herzmuskelstreifen gezeigt werden, dass FTY 720 zur Phosphorylierung, also Aktivierung der bekannten „prosurvival“ Kinase Akt führt [6]. Die Akt-Kinase ist Teil des RISK-Signalweges (reperfusion injury salvage kinase pathway) [8], welcher als gemeinsam genutzter Signalweg der beiden ischämieprotektiven Interventionen Prä- und Postkonditionierung gilt. Ebenso verbesserte FTY 720 die postischämische mechanische Funktionserholung sowohl des humanen Herzmuskelstreifen, als auch des Rattenherzen [6].

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sich FTY 720 möglicherweise auch zur pharmakologischen Postkonditionierung eignen könnte.

## 1.2. Sphingosin-1-Phosphat

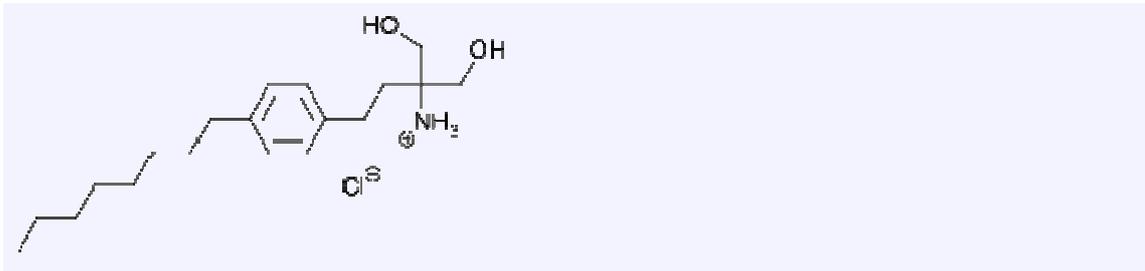
Sphingosin-1-Phosphat (kurz: S1P) ist eine physiologische Komponente des Blutes und anderer extrazellulärer Flüssigkeiten und wird in größeren Mengen in Thrombozyten und Erythrozyten gespeichert [9].

S1P ist das zur Zeit am besten charakterisierte Mitglied der wachsenden Familie der Lysophospholipidmediatoren. Es bindet mit geringer niedermolekularer Affinität an 5 G-Proteingekoppelte Rezeptoren S1P1-5 [10] und bewirkt dadurch über second messenger wie cAMP, Ca<sup>2</sup>, und MAP-Kinasen eine Signaltransduktion in die Zelle [11].

S1P beeinflusst als signalaktives Lysophospholipid viele biologische Funktionen, wie Zellmigration, zytoskelettale Organisation, Zellüberleben und Differenzierung [10]. S1P wurde ursprünglich als endothelialer Wachstumsfaktor betrachtet, da es Angiogenese [12], erhöhte Vasopermeabilität [9] und vaskuläres Wachstum bewirkt und am vaskulären Tonus beteiligt ist [13].

S1P und dessen Rezeptor S1P1 kontrollieren die T-Zell-Migration von Thymus und Sekundär Lymphatischen Organen in die Peripherie bei Inflammation [14]. T- und B-Lymphozyten sind die Hauptbestandteile der Adaptiven Immunität. Sie zirkulieren zwischen den Sekundär Lymphatischen Geweben zur Erfassung von Antigenen. Nach der Aktivierung in den Lymphatischen Organen werden die T-Zellen in die Zirkulation ausgeschwemmt, um Infektionsherde zu erreichen. Der Mechanismus der Regulation von Lymphatischen Organen ist unbekannt [14].

### 1.3. FTY 720= Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoragonist:



**Fig. 1: Molekularstruktur von FTY 720**

Das klinische Immunsuppressivum FTY 720 ist ein Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoragonist, das durch die Sphingosin-2-Kinase phosphoryliert und dadurch in die aktive Form umgewandelt wird. Es bindet an 4 von 5 S1P Rezeptoren, nämlich: S1P1,3,4 und 5, aber nicht an S1P2 [14].

FTY 720 induziert eine Lymphopenie im peripheren Blut, wohl v. a. durch das Verhindern von einer Lymphozytenausschwemmung aus Thymus und Lymphknoten [16].

Dabei inhibiert FTY 720 die Möglichkeit von Lymphozyten an Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren zu binden, indem es diese Rezeptoren blockiert und von der Zelloberfläche irreversibel internalisiert. Letzteres betrifft v. a. den Rezeptor S1P1. Somit wird eine Reduktion von zirkulierenden Lymphozyten durch FTY 720 herbeigeführt, indem es eine Sequestration von Lymphozyten in Sekundär Lymphatischen Organen und im Thymus vornimmt [18].

Gleichzeitig beeinflusst FTY 720 möglicherweise die Produktion von IL-1 und spielt eine Rolle in der Freisetzung von neutrophilen Granulozyten [17]. Es wurde in klinischen Experimenten gezeigt, dass FTY 720 einen großen Effekt in Allotransplantationsmodellen [15] und bei Autoimmunkrankheiten hat [16].

So wird FTY 720 zur Behandlung der Multiplen Sklerose bereits eingesetzt. Es verhindert hierbei entscheidend die Zerstörung der Myelinhülle durch T-Lymphozyten [16].

#### **1.4. Bedeutung von Sphingosin-1-Phosphat auf Ischämie/Reperfusion**

Kürzlich wurde in Studien über S1P gezeigt, dass es vor Ischämie/Reperfusionsschaden sowohl ex vivo als auch in vivo schützen kann [6], [19], [20].

Einen sehr positiver Effekt im Bezug auf die Erholung der mechanischen Funktion und Infarktgrößenreduktion konnte S1P im Langendorff ex vivo Modell nachgewiesen werden [6].

Im Langendorff ex vivo Modell des isolierten Herzens wurden exogenes S1P und auch das Gangliosid GM1, das die intrazelluläre Bildung von S1P steigert, vor der Ischämieperiode appliziert. Sie reduzierten beide die CK-Freisetzung und Infarktgröße, und verbesserten ebenso die mechanische Funktion des Herzens [19].

Ebenso zeigen Studien in Mausherzen, dass S1P vor Ischämie/Reperfusionsschaden in vivo schützt, indem es die Aktivierung der Apoptose in der Ischämiezone verhindert. Als ein Mechanismus wurde gezeigt, dass S1P die neonatalen Kardiomyozyten vor der Apoptose durch eine wirkungsvolle Herabsetzung der Leukozytenadhäsion schützt [20].

Mehrere Studien liefern somit gute Hinweise, dass S1P in ex vivo und in vivo Modellen ischämieprotektiv wirkt.

### **1.5. Fragestellung zum Thema meiner Doktorarbeit**

Ausgehend von einigen positiven Resultaten der Substanz FTY 720 als ischämieprotektives Pharmakon ex vivo wollen wir das therapeutische Potential der Substanz im in vivo Infarktmodell weiter untersuchen.

- a) Ist FTY 720 vor Reperfusion appliziert in der Lage Infarktgröße zu reduzieren?
  
- b) Welchen Einfluss hat die Behandlung auf Granulozyteninfiltration, proinflammatorische Zytokinexpression und Apoptose?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Tiere und Tierhaltung**

Für die Tierversuche wurden 109 männliche Wistar-Ratten der Fa. Harlan –Winkelmann GmbH (33176 Borcheln, Deutschland) mit einem Körpergewicht von 350 - 400 g verwendet.

Fünf Ratten wurden in einem Käfig mit freiem Zugang zu Futter und Trinkwasser unter vollklimatisierten Bedingungen mit einem 12 Stunden-Tag-Nachtrhythmus im Tierstall der Universitätsklinik Gebäude Innere Medizin D 20, Josef- Schneider- Str. 2, 97072 Würzburg gehalten. Die Tiere wurden täglich zur Kontrolle der Gewichte und der Futter- und Trinkmengen visitiert.

Ein genehmigter Tierschutzantrag für das Projekt durch die Regierung von Unterfranken lag zu Studienbeginn vor.

### **2.2. Arbeitsvorgang**

In den Tierversuchen mit den Ratten haben wir 45-minütige Ischämieperioden durchgeführt. Vor der Operation wurden die Tiere gewogen, in einem mit Isoflurangefüllten Topf narkotisiert und dann intubiert. Die Operation wurde durch 1,5%iges Isofluran aufrechterhalten, d.h. dass die Tiere während der Operation vollnarkotisiert waren und mithilfe eines Volumen- zirkulierenden Atemgerätes beatmet wurden.

Bei je 20 Tieren pro Serie wurde durch die 45-minütige Unterbindung der linken Koronararterie ein Infarkt induziert. Dabei wurde unterhalb der Rippenbögen innerhalb der Pektoralismuskulatur ein bis zu 2 cm großer Schnitt vorgenommen und das Herz aus dem Thorax luxiert, um die linke Koronararterie mit einem 6-0 er Prolene Faden über einen Gewebefließ

geknotet zu ligieren. Das Flies dient dazu die Ligatur atraumatisch durchzuführen, sodass nach Lösen des Knotens eine Reperfusion möglich ist. Zeitgleich haben wir eine einmalige i. p. Gabe von 0,5 mg/kg KG FTY 720 oder 0,5 mg/kg KG 0,9%iges NaCl (je nach Gruppe) verabreicht. Gleichzeitig wurden jedem Tier 10µg Temgesic als Analgetikum subkutan zur Schmerzreduktion verabreicht.

Während der 45 min wurde das Tier unter Narkose belassen und ein EKG angelegt, um Infarktzeichen zu erkennen.

Sodann wurde die Ligatur wiedereröffnet und der Faden in situ belassen. Genaue Reperfusion wurde bestimmt durch visuelle Inspektion, Änderungen der ventrikulären Funktion und EKG-Veränderungen. Die Brustwand der Tiere wurde mit einem 6-0er Faden kontinuierlich verschlossen. Nach Ablauf der darauffolgenden 24-stündigen Reperfusionsphase wurde die linke Koronararterie wieder an gleicher Stelle mittels des belassenen Ligaturfadens verschlossen. Danach haben wir die *V. carotis* freigelegt und jeweils ein EDTA- und Serum-Röhrchen Blut abgenommen, um die systemische Wirkung der Substanz anhand der Lymphozytenzahl im peripheren Blut der Tiere mit Hilfe eines automatisierten Hämozytometers (Sysmex XE 2100) nach Versuchsende zu bestimmen. Nach der Blutentnahme haben wir 3 ml 5%igem Evans Blue vor Organentnahme i. v. in die *V. carotis* gespritzt, um das Gebiet außerhalb des Infarktareals blau zu färben. Somit konnten wir eine "area at risk" ausmachen, die das von dem verschlossenen Gefäß perfundierte Myokardareal darstellt, und mit der Farbe rot abgrenzbar ist.

Bei weiteren 13 Tieren haben wir eine Vorbehandlung mit FTY 720 i. p. 24 h vor Infarzierung vorgenommen, um herauszufinden, ob dadurch eine größere Reduktion der Infarktgröße resultieren könnte.

### **2.3. Gewebeaufbereitung**

Nach Entnahme des Herzens und der beiden Lungen wurden diese in NaCl 0,9% gewaschen und voneinander getrennt. Es erfolgte die Bestimmung von Lungen- und Herzgewicht.

Sodann wurde der rechte Ventrikel abgetrennt und der verbleibende linke Ventrikel für 30 min bei -20°C in einer mit dem Einbettmittel Tissue Tek gefüllten Plastikschale eingefroren.

Danach wurde der linke Ventrikel senkrecht zur langen Achse in parallele horizontale Scheiben geschnitten und 10 min mit 1,5%igem TTC- Reagenz in einem Wasserbad bei 37°C zur Infarktgrößenbestimmung als Prozentsatz der jeweiligen „area at risk“ gefärbt. TTC färbt vitales Gewebe rot.

TTC- negative (also weiße) Areale stellen die definitive Infarktzone dar. Bei weiteren 10 Tieren je Versuchsserie wurde nach Ablauf der 24 h Infarktdauer das Herz entnommen und in 3 Anteile senkrecht zur langen Achse geteilt:

Der basale Anteil wurde in 10%igem Formalin fixiert und in Paraffin für entsprechende histologische Schnittpräparate eingebettet.

Der mittlere Anteil auf Papillarmuskelhöhe wurde in flüssigem Stickstoff, getrennt nach makroskopischer Infarktzone, intaktem Myokard und Borderzone, als Grenzzone zwischen intaktem Myokard und Infarktzone, asserviert.

Der apikale Anteil (Herzspitze) wurde in OCT-Medium für die spätere Immunhistologie auf Kryostatschnitten eingefroren.



**Fig 2: geschnittene Herzscheiben nach Inkubation in 1,5%igem TTC-Reagenz**  
**blaues Areal: mit Evans-Blue angefärbte, vom Infarkt nicht betroffene**  
**Zone, weißes Areal (grün umrandet) : definitive Infarktzone**

## **Material**

### **Temgesic**

Morphium-Injektionslösung 0,3 mg/ml für Tieroperationen, Fa. Essex Pharma-GMBH, Thomas-Dehler-Str.27, 81737 München

### **5%iges Evansblue**

aus 2,5 g Evansblue von Sigma E-2129  $\mu$ l (1000U) Heparin, ad 50 ml PBS bei 4°C gelagert

### **Tissue Tek**

Einbettmittel für Histologie, Fa. Sakura Finetek Europe, 2380 AA Zoeterwoude, The Netherlands.

### **1,5%iges TTC Reagenz**

1 g 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (Sigma T-8877), ad 50 ml PBS bei 4°C gelagert

## 2.4. Bewertung der „area at risk“ und der Infarktgröße

Die „area at risk“ und die Infarktgröße wurde genauso bestimmt, wie es kürzlich beschrieben wurde [35]. Nach 24 h wurden die Tiere wiederum intubiert, die Ligatur wurde wieder verschlossen und in den rechten Ventrikel wurde 5%iges Evans blue injiziert. Die Rattenherzen wurden herausgeschnitten und in 6 Teile geteilt. Diese Schnitte wurden für 30 min in 1,5%iges Triphenyltetrazolium Chlorid (TTC) inkubiert. Nach der TTC-Färbung wurden die vitalen Myokardanteile rot und die Infarktareale bleich gefärbt. Die Schnitte wurden mit einer Waage gewogen und fotografiert und das Infarktareal für jeden Schnitt mittels eines Computer-Planimetrie-Programms (ImageJ imaging software) ausgewertet. Die Ränder wurden exakt umfahren und dadurch direkt mit dem originalen Gewebestück verglichen, damit die verschiedenen Gebiete genau abgemessen werden konnten (Fig. 2). Alle Messungen wurden direkt innerhalb von 24 h nach der Färbung ausgewertet, damit man die Farben optimal erkennen und den Kontrast zwischen den verschiedenen Gebieten sehen konnte.

Die Infarktgröße wurde mit den folgenden Berechnungen ermittelt:

$$\text{Infarktgewicht} = (A1 \times Wt1) + (A2 \times Wt2) + (A3 \times Wt3) + (A4 \times Wt4) + (A5 \times Wt5)$$

A ist der Prozentanteil des Infarktgebietes gemessen durch Planimetrie,

Wt ist das Gewicht von jedem Schnitt.

Prozentsatz des infarzierten linken Ventrikel =

$$(\text{Infarktgewicht} / \text{Gewicht des linken Ventrikels}) \times 100.$$

Area at risk als Prozentsatz des linken Ventrikel =

$$(\text{Gewicht des linken Ventrikel} - \text{Gewicht des blaugefärbten linken Ventrikel}) / \text{Gewicht des linken Ventrikel}$$

## **2.5. Differenzial-Blutbild**

Nach 24 h Reperfusion wurde Blut aus der rechten *V. carotis* jeden Tieres kurz nach der Herzentnahme gewonnen und in EDTA- Röhren gegeben. Differenzial Leukozytenzählung wurde durch automatische Analysierer vorgenommen (Sysmex, XE 2100).

## **2.6. Herstellung von Gefrierschnitten**

Die tiefgefrorenen Gewebelöcke wurden in flüssigem Stickstoff bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Einbettung wurden die Gewebelöcke in ca.  $1\text{ cm}^3$  große Aluminiumfolienformen gelegt und mit flüssigem Tissue- Tek eingebettet. Bei  $-20^{\circ}\text{C}$  wurden die eingebetteten Gewebeproben auf einen wiederum mit Tissue- Tek benetzten Metallblock angeklebt, die in einen Kryostaten gestellt wurden. Anschließend wurden mit Hilfe des Kryostaten Dünnschnitte von  $5\mu\text{m}$  Schichtdicke angefertigt und auf Objektträger überführt. Diese fertigen Schnitte wurden bis zur Weiterverarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## **2.7. Immunhistologie auf Gefrierschnittpräparaten**

Dieser Test hat zum Ziel, Antigene in Geweben oder Zellen nachzuweisen. Das Prinzip besteht darin, dass die nachzuweisenden Antigene strukturgebunden in Gewebeschnitten oder Zellausstrichen vorkommen.

Im ersten Schritt wird ein spezifischer Antikörper (Primärantikörper) auf das zu untersuchende Gewebe/Zellen aufgebracht. In einem zweiten Schritt wird ein Antikörper aufgetragen, der sich gegen das Fc- Fragment des Primär-Antikörper richtet. Das ist der sogenannte Sekundärantikörper, der hier mit einem Enzym gekoppelt ist und die Farbentstehung mit einer

Enzym-Substrat-Reaktion auslöst. Dadurch wird die zu untersuchende Struktur mikroskopisch sichtbar gemacht.

Zu Beginn der Färbung ließen wir die Schnitte 20 min trocknen und fixierten sie mit Aceton für 10 min bei Raumtemperatur. Danach ließen wir die Schnitte 10 min trocknen und umrandeten sie mit einem Paraffinstift. Die Schnitte wurden nun für 5 min in Aqua dest. getaucht und dann 30 min in 0,3%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei Raumtemperatur inkubiert, um die Peroxidase des Gewebes abzusättigen.

Danach wurden die Schnitte dreimal für je 5 min in PBS gespült und 20 min in 1%iges Normalserum (Serum der Spezies des 2. Antikörpers) gegeben.

Nach Inkubation mit dem primären und einem biotinylierten zweiten Antikörper wurde für 30 min ein AB-Komplex, bestehend aus Avidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase, aufgetragen. Zur Detektion der Peroxidaseaktivität wurde 3,3-Diaminobenzidin als Chromogen in Aqua dest. appliziert und 10 min auf die Schnitte gegeben. Die zu untersuchten Zellstrukturen wurden somit sichtbar gemacht.

Danach spülten wir die Schnitte 5 min in Aqua dest. und deckten sie mit Mowiol (Fa. Calbiochem- Novabiochem, 65812 Bad Soden) ein.

## **Material**

### **10x PBS**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>            11,5 g (Sigma S-9763)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>            2 g    (Sigma P-0662)

NaCl                80 g   (Sigma S-9625)

KCl                 2 g    (Sigma P-3911)

Aqua dest.         Ad 1l

pH 7,4

für 1x PBS 1:10 mit Aqua dest verdünnen.

### **0,3%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Aqua dest.            198ml  
30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>    2ml (Sigma H1009)

### **1%iges Normalserum**

PBS                    10ml  
Normalserum    100µl    Vector  
DAB-Komplex:            Vector  
ABC-Komplex:            Vector  
Sekundär-Antikörper:    Vector

## **2.8. Gewinnung von Gewebe, Proteinbestimmung nach Bradford, Caspase 3 Aktivität**

Bei dem zu untersuchenden Gewebe handelte es sich um unsere entnommenen Rattenherzen, bei denen vor der Bestimmung Bindegewebe und Blutreste entfernt wurden. Anschließend wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff nativ eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die Homogenisierung der Gewebeprobe erfolgte in einem 5x Lysispuffer, der zuvor 1:5 mit Aqua dest. verdünnt wurde.

Zum Aufschluss des Gewebes wurden gekühlte Glas- Glas-Homogenisatoren verwendet, in die das Gewebe mit 500-1000µl Lysispuffer gefüllt und homogenisiert wurde.

Das Herzgewebe wurde in Standard RIPA buffer mit Protease Inhibitoren (Cocktail III), Phosphatase Inhibitor (Cocktail II, jeder von Calbiochem.) lysiert.

Danach wurde das Homogenisat 10 min auf Eis inkubiert und dann 10 min bei 14000U/min und 4°C zentrifugiert. Dadurch wurden Zelltrümmer und Organellen sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und wiederum zentrifugiert. Aus dem zentrifugierten Homogenisat wurde der Überstand abgenommen und für die Proteinbestimmung nach Bradford verwendet.

TNF alpha Protein aus Serum und Borderzonengewebe wurde durch einen ELISA kit nachgewiesen, angeleitet durch den Hersteller Biosource (KRC 3001).

## **Material**

### **Kit Komponenten**

5X Cell Lysis Puffer

5X Assay Puffer

Caspase 3-Substrate (Ac-DEVD-pNA): 1ml von 3 mg/ml Lösung

Caspase 3-Inhibitor ( Ac-DEVD-CHO): 50µl von 100µM

pNA-Standard: 250µl von 10mM in DMSO

Die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) beruht auf dem Prinzip der Verschiebung des Absorptionsspektrums von Coomassie Blau von 465 nm nach 595 nm. Durch die Bindung des Farbstoffs an Proteine wird die nachzuweisende Struktur sichtbar gemacht (aus Wikipedia, Antikörperfärbung).

Es wurde eine Standardreihe der Konzentration 1 µg, 4 µg, 8 µg, 12 µg, 16µg und 20 µg erstellt und zu diesen Konzentrationen je X = 1 µl Lysispuffer hinzugefügt. Danach wurde die Standardreihe mit Aqua dest. auf 800 µl aufgefüllt und je 200 µl Bradford hinzugegeben.

Dem Leerwert wurden auch 1 µl Lysispuffer hinzugefügt, er wurde ebenfalls mit Aqua dest. auf 800 µl aufgefüllt und erhielt 200 µl Bradford. Die Probe wurde ohne Lysispuffer mit Aqua dest. auf 800 µl aufgefüllt und erhielt auch 200 µl Bradford.

Danach wurde die Verdünnungsreihe 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 595 nm im Spektralphotometer gemessen. Durch die Messung der Absorption bei dieser Wellenlänge konnte die Konzentration

der unbekanntem Proteinlösung des Herzgewebes einfach bestimmt werden. Die hierbei ermittelten Absorptionswerte wurden gegen die Proteinkonzentrationen in einer Graphik aufgetragen. Aus der Ausgleichsgeraden der Standards wurde nun die Proteinkonzentration des Herzgewebes ermittelt.

### **Material**

Standard: Biorad 5000007

Bradford-Reagenz: Biorad 5000006

### **2.9. Caspase 3 Aktivität**

Wir untersuchten die Wirkung von FTY 720 auf die Caspase 3 Aktivität im infarzierten Herzgewebe der Ratten, um einen möglichen Einfluss von FTY 720 auf das Überleben der Zellen nachzuweisen.

Als erstes verdünnten wir 5X Lysispuffer 1:5 mit AD. Dann homogenisierten wir das Herzgewebe mit dem verdünnten Lysispuffer und inkubierten es 10 min auf Eis.

Nach 10 minütigem Zentrifugieren bei 14000U/min und 4°C nahmen wir den Überstand ab und zentrifugierten das Homogenisat wiederum für 10 min.

Um eine Standardkurve mit den Konzentrationen 1000 µg, 500 µg, 250 µg, 125 µg, 50 µg, 25 µg und 12,5 µg herzustellen, verdünnten wir 5X Assaypuffer 1:5 mit Aqua dest. und pipettierten es zusammen mit dem pNA-Stock in eine 96well Flachboden-Platte ( siehe Tabelle 1).

Am Ende der Verdünnungsreihe waren in jedem well 100µl enthalten.

**Tab. 1: Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Caspase 3 Aktivität:**

Inhibitor	5X Assaypuffer	Probe	1X Lysispuffer	Aqua dest.
Blank 0 µl	20 µl	0 µl	30 µl	40 µl
Probe 0 µl	20 µl	30 µl	0 µl	40 µl
Probe + Inhibitor 1 µl	20µl	30µl	0µl	40µl

Nach dem Pipettieren der 96 well Platte inkubierten wir sie 10 min bei Raumtemperatur und gaben dann zu jedem well 10µl Substrat hinzu. Danach wurde sofort die Messung bei 405 nm als Baseline durchgeführt.

Der Umsatz in den Proben wurde jeweils zum Zeitpunkt t=0 min, t=30 min, t=60 min, t=90 min und t=120 min gemessen (Textbook of Caspase 3- Colometric Activity Assay Kit, April 2001). Von der jeweiligen Probe wurde die Differenz des Substratumsatzes zum Zeitpunkt t=0 min, t=30 min, t=60 min, t=90 min und t=120 min errechnet. Daraus erhielt man den Umsatz der Caspase, der innerhalb von 120 min in der Probe stattfand.

Danach substrahierten wir den errechneten Substratumsatz der Probe 2 (mit Caspase 3-Inhibitor) vom Substratumsatz der Probe 1 (ohne Caspase 3-Inhibitor).

Das Ergebnis stellt nun die Caspase 3 Aktivität als Caspase 3-Substratumsatz dar.

## **2.10. Auswertung der Caspase 3 Aktivität**

### Proben:

Von jedem Messpunkt muss der Baselinewert abgezogen werden. Dann wird von jeder Probe der Blank abgezogen. Ausgewertet wird der Zeitpunkt, an

dem die Caspase 3 Aktivität ein Plateau erreicht. Um die spezifische Caspase 3 Aktivität zu ermitteln, wird von der Aktivität der Probe noch die Aktivität der inhibierten Probe abgezogen.

#### Standardkurve:

Hierbei wird von allen Konzentrationen der Blank abgezogen und die Konzentration auf der X-Achse und der OD-Wert auf der Y-Achse aufgetragen.

Die Proben wurden 2 h lang bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Wir wählten die Inkubationstemperatur von 37°C, weil bei 37°C eine deutliche Caspase 3 Aktivitätssteigerung zu erwarten ist.

Zu Beginn der Messung wurde das Caspase 3-Substrat zugegeben und an 4 Messzeitpunkten gemessen. Es wurden die Messzeitpunkte (t = 0 min, t = 60 min, t = 90 min und t = 120 min) übernommen. Die Caspase 3 Aktivität wurde mit Hilfe eines Fluoreszenz- Spektrophotometers in Fluoreszenzeinheiten gemessen.

Die Fluoreszenz- Spektrophotometrie wurde mit Materialien aus dem Caspase 3- Colometric Assay Kit, Firma Chemicon APT 165, USA durchgeführt. Zur Messung der Caspase 3 Aktivität verwendeten wir ein Fluoreszenz- Spektrophotometer der Firma TECAN, Typ Spectra Rainbow, (Art Nr. F039034, Voltage: AC 100-120/220-240, Serien Nr: 334075, Made in Austria) das die Emission der Substanz in Abhängigkeit zur Exzitation misst. Das Gerät enthält eine 150W Xenon-Lampe und konkave, gitterartige Monochromatoren.

#### Material

Colorimetric Aktivitätsassay von Chemicon, APT 165.

Kit Komponenten:

5X Zell-Lysispuffer

5X Assay Puffer

Caspase 3-Substrat (Ac-DEVD-pNA)

Caspase 3-Inhibitor (Ac-DEVD-CHO)

pNA Standard; 250µl von 10mM in DMSO

## **2.11. Enzym linked Immuno Sorbent Assay- ELISA**

Mit der ELISA- Methode können Konzentrationen von Zytokinen und Proteinen im Mikro- bis Picogrammbereich gemessen werden. Das Prinzip der Methode beruht auf der Bindung eines spezifischen monoklonalen Primärantikörpers an das zu messende Antigen. Der Primärantikörper wird von einem polyklonalem Sekundärantikörper gebunden. Der Sekundärantikörper ist an ein Enzym gekoppelt, das zu einem Farbumschlag beim zugegebenen Substrat führt. Dieser Farbumschlag wurde photometrisch mit dem Spektralphotometer der Fa. Tecan (Deutschland GmbH) bestimmt. Mittels einer Standardkurve mit bekannten Antigenkonzentrationen konnte die Konzentration des zu messenden Proteins oder Zytokins errechnet werden.

## **2.12. TNF- alpha Bestimmung im Serum und in der Infarkt**

### **Borderzone**

TNF- alpha Protein aus Serum und Borderzonengewebe wurde durch einen ELISA kit nachgewiesen, angeleitet durch den Hersteller Biosource (KRC 3001).

Für die TNF- alpha Bestimmung im Serum verwendeten wir wiederum eine 96 well flatbottom Platte, in die wir (außer in den blank) 50 µl Incubation buffer in die jeweiligen blades mit absteigender Konzentration 1000 µg, 500

µg, 250 µg, 125 µg, 62,5 µg, 31,25 µg und 15,6 µg pipettierten. Ebenso wurden 100 µl Standard und 100 µl Probe pipettiert.

In alle Wells wurde 50 µl Anti-TNF-Alpha-Biotin (außer in den Blank) gefüllt, die flatbottom Platte für 1 ½ h inkubiert und danach gewaschen.

Nun gaben wir jeweils 100 µl Streptavidin-HRP in alle Wells (außer in den Blank) und wuschen die Platte nach 45 minütiger Inkubation.

Danach wurde jeweils 100 µl Chromogen in alle Wells inklusive Blank gegeben und nach 30 min jeweils 100 µl Stop- Solution in alle Wells inklusive Blank pipettiert.

Die TNF- alpha- Serummessung wurde wiederum mittels des oben genannten Fluoreszenz- Spektrophotometers in Fluoreszenzeinheiten bei 450 nm gemessen.

## **Material**

Immunoassay Kit (Hersteller Biosource, KRC 3011)

Kit Komponenten:

TNF-alpha Standard (rekombinante Rt TNF-alpha)

Incubation Buffer (8mM Natrium-Acid)

Biotin-labeled anti-Rt TNF-alpha

Streptavidin-Peroxidase (HRP)

Stabilized Chromogen, Tetramethylbenzidine (TMB)

Stop-Solution

### **2.13. Statistische Analyse**

Alle angegebenen Daten sind als Mittel und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ausgedrückt. Statistische Analysen wurden mittels WinStat Software gemacht. (Benecke & Schwippert; Staufen, Deutschland), ausgewertet in Excel Tabellen. Multiple Vergleiche zwischen den Gruppen wurden mit ANOVA Analyse vorgenommen. Einzelne Vergleiche von Variablen zwischen 2 Gruppen wurden mittels unpaired Student`s t-test erstellt.

P-Werte  $< 0,05$  wurde als signifikant betrachtet.

### 3. Ergebnisse

Um die Wirkung von FTY 720 auf die Herzinfarktgröße beurteilen zu können, wurden die Tiere in 3 Gruppen eingeteilt. In allen 3 Gruppen wurde den Tieren analog zur pharmakologischen Postkonditionierung unmittelbar nach dem Setzen der Ligatur eine Substanz (entweder FTY 720 oder NaCl) i. p. gespritzt. Die erste Gruppe stellt die Kontrollgruppe dar. Darin befinden sich die Tiere, die mit 0,9%igem NaCl i. p. nach dem Setzen der Ligatur vor Reperfusionbeginn behandelt wurden. Anhand dieser Gruppe wurden die mit FTY 720 behandelten Tiere in den beiden anderen Gruppen verglichen.

Die zweite Gruppe stellt die Tiergruppe dar, die nach dem Setzen der Ligatur vor Reperfusionbeginn mit FTY 720 behandelt wurden. Diese Gruppe wird in den folgenden Abbildungen „FTY 720 post“ genannt.

Die dritte Gruppe beinhaltet die Tiere, die sowohl mit FTY 720 24 h vor der Infarzierung, als auch wie in den beiden anderen Gruppen kurz nach dem Setzen der Ligatur mit FTY 720 behandelt wurden. Diese Gruppe wird in den Abbildungen „FTY 720 pre+ post“ genannt. In dieser dritten Gruppe wurden die Tiere demnach zweimalig mit FTY 720 behandelt, währenddessen in der zweiten Gruppe nur eine einmalige FTY 720-Gabe vorgenommen wurde.

Die Einteilung der Tiere in die ersten beiden Gruppen, also die Kontrollgruppe und die FTY 720 post- Gruppe, nahmen wir vor, um herauszufinden, ob die Behandlung mit FTY 720 im Vergleich zur Placebo-Behandlung (NaCl) einen Effekt auf die Infarktgröße besitzt. Damit sollte die Wirkung von FTY 720 an Tieren getestet werden, die mit diesem Medikament behandelt wurden, im Vergleich zu jenen Tieren, die kein FTY 720 erhalten haben. Die Tiere wurden zufällig den Versuchsgruppen zugeteilt. Nach der Untersuchung dieser beiden Testgruppen stellte sich heraus, dass die Tiere der FTY 720 post- Gruppe, also jener Tiere, die

einmalig mit FTY 720 vor Reperfusionbeginn behandelt wurden, Herzrhythmusstörungen entwickelten.

Weil wir vermuteten, dass der proarrhythmische Effekt nur ein „first-dose-Effekt“ ist und dass eine Vorbehandlung mit FTY 720 möglicherweise effektiver sein würde als eine Nachbehandlung mit FTY 720, haben wir eine weitere Serie von Tierexperimenten gestartet.

In dieser dritten Gruppe wurde den Tieren 24 h vor und dann nochmals direkt vor Reperfusionstart, wie in den beiden ersten Gruppen, FTY 720 i. p. gespritzt.

Somit wurden die Tiere in die folgenden 3 Gruppen unterteilt:

1. Kontrollgruppe (diese Tiere erhielten direkt nach der Ligatur der linken Koronararterie 0,9%iges NaCl i. p.)
2. FTY 720 post- Gruppe (diese Tiere erhielten direkt nach der Ligatur der linken Koronararterie 0,5 mg/kg KG FTY 720 i. p.)
3. FTY 720 pre+ post- Gruppe (bei dieser Gruppe wurde 24 h vor und nochmal direkt nach dem Setzen der Ligatur 0,5 mg/kg KG FTY 720 i. p. gespritzt)

### **3.1. Überleben der Tiere**

Das Überleben in den einzelnen drei Gruppen war unterschiedlich.

37% der Tiere in der Kontrollgruppe starben innerhalb einer Stunde nach Ischämiebeginn. Ebenso starben 50% der Tiere in der mit FTY 720 post-Gruppe, also der FTY 720 post- Gruppe und 14% der Tiere in der FTY 720 pre+ post- Gruppe innerhalb einer Stunde nach Ischämiebeginn. Die Ursache für das zahlreiche Sterben waren das gehäufte Auftreten von ventrikulären Tachyarrhythmien, Kammerflimmern und schließlicher Bradykardie, die trotz Herz-Druck-Massage nicht beherrschbar waren.

Im Folgenden werden 2 Ekg Auszüge im Vergleich zueinander dargestellt, um das Ausmaß der ventrikulären Herzrhythmusstörung während der Reperfusion nach FTY 720-Gabe zu zeigen.

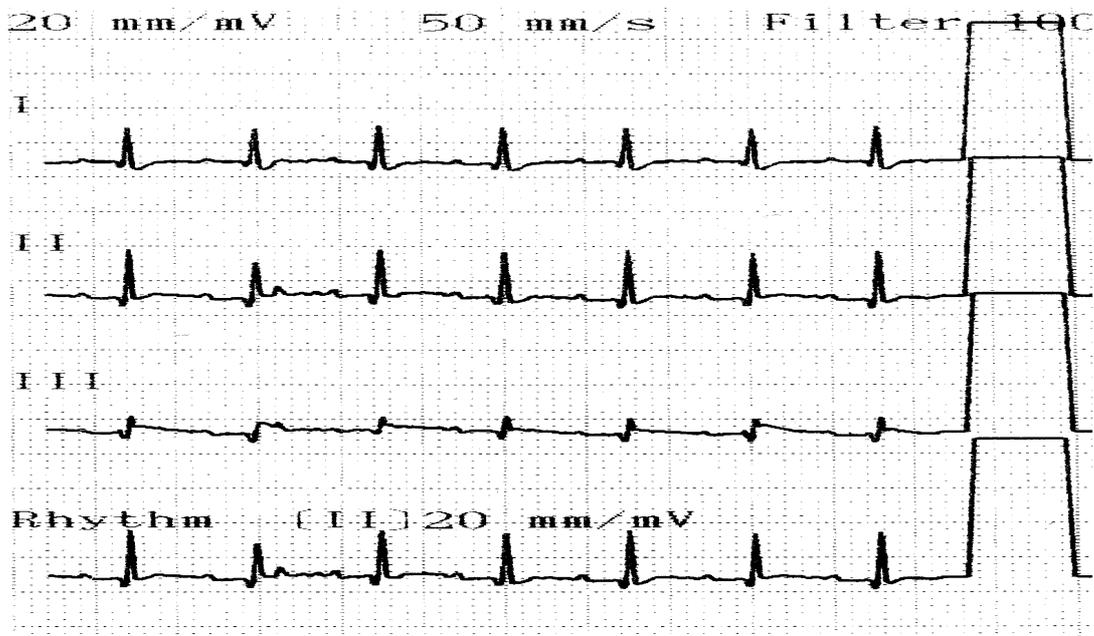


Fig. 3 :normales EKG bei Operationsbeginn

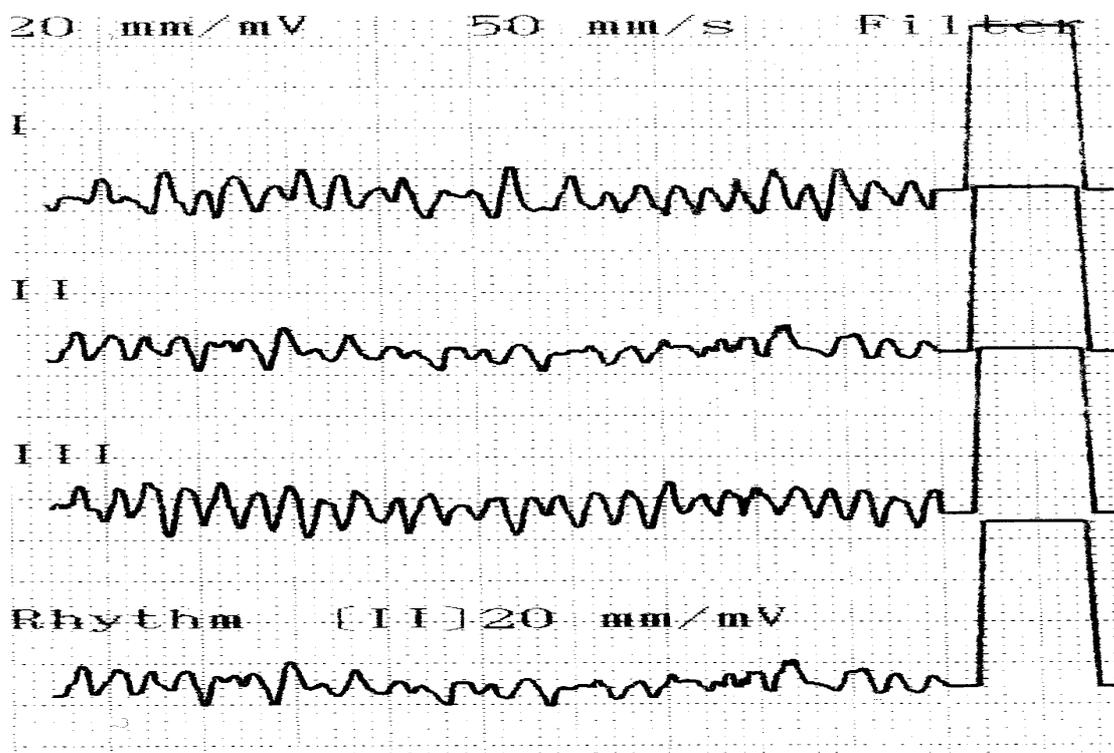
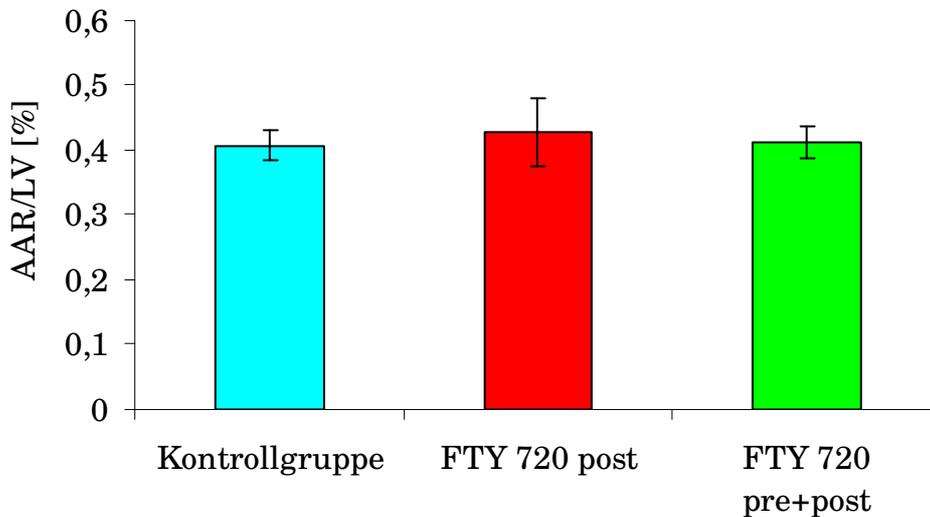


Fig. 4: Arrhythmie bei der FTY 720 pre + post- Gruppe in 15 min Reperfusion

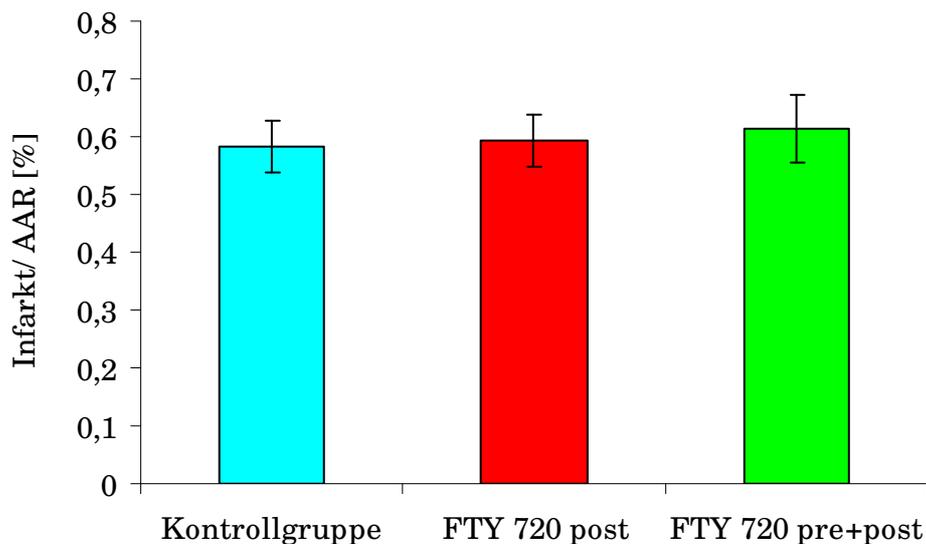
### 3.2. Infarktgröße

Es konnte gezeigt werden, dass nach 45 minütiger Ligatur und 24 h Reperfusion das Gebiet der linken Herzkammer (left ventricular area =LV), das von dem Infarkt betroffen war (infarct area), bezogen auf das Risikogebiet (area at risk =AAR) nicht signifikant unterschiedlich zwischen den experimentellen Gruppen war (AAR/LV) (Fig. 5). Sowohl die Kontrollgruppe, als auch die FTY 720 post- Gruppe und die FTY 720 pre+ post- Gruppe hatten ein annähernd gleich großes Risikogebiet (Fig. 5).

In Bezug auf die Infarktgröße zeigte sich weder bei der FTY 720 post- Gruppe noch der FTY 720 pre+ post- Gruppe eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch hier ist die Infarktgröße in allen 3 Gruppen annähernd gleich. Demnach reduzierte FTY 720 die Infarktgröße nicht. (infarct area/AAR) (Fig. 6).



**Fig:5: Risikogebiet (area at risk=AAR) in Bezug zum linken Ventrikel (LV) in Prozent (%). Keine signifikante Reduktion der area at risk der mit FTY 720 behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe.**



**Fig.6: Infarktgröße der Kontrollgruppe, der mit FTY 720 post- Gruppe und der mit FTY 720 pre+ post- Gruppe gemessen an Infarktgröße in Bezug auf AAR in Prozent.**

**Keine Reduktion der Infarktgröße der mit FTY 720 behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe in Prozent.**

### **3.3. Lymphopenie durch FTY 720 im peripheren Blut**

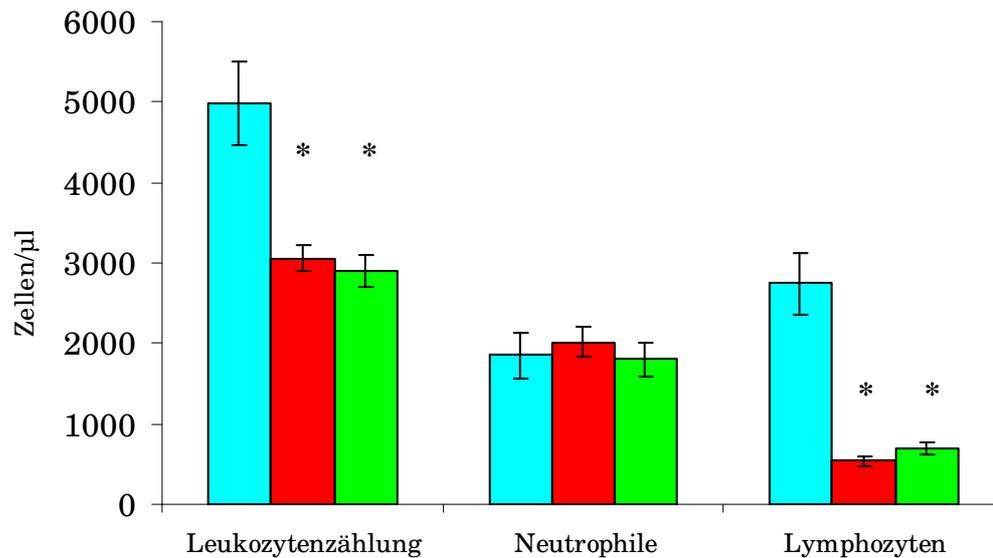
Die Untersuchung der mit FTY 720 behandelten Tiere ergab eine signifikante Reduktion der Lymphozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe im peripheren Blut nach 24 h (Fig. 7 und 8).

Zwischen den beiden Gruppen der mit FTY 720 behandelten Tiere kam es zu keinem signifikanten Unterschied der Lymphozytenanzahl (Fig. 7 und 8).

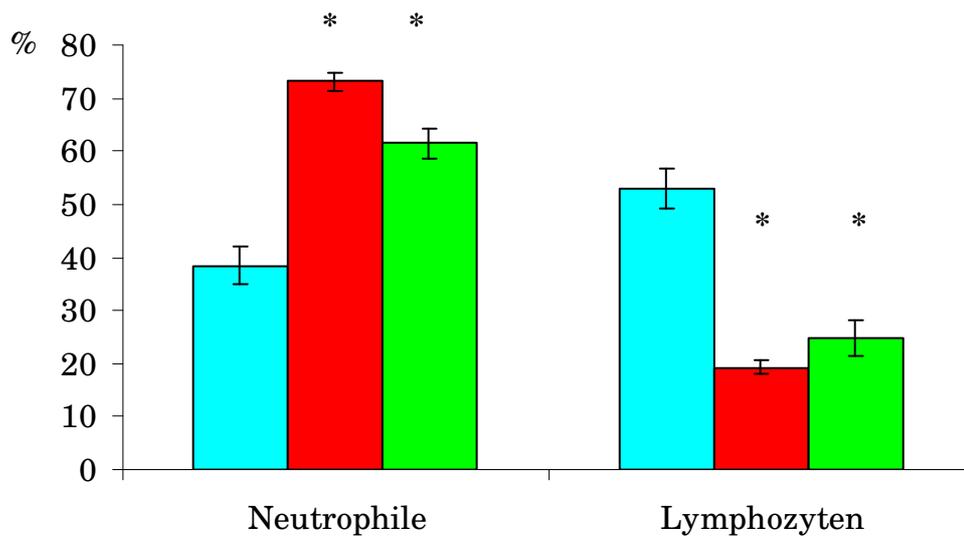
In Figur 7 wurde nachgewiesen, dass die Gabe von FTY 720 sowohl in der FTY 720 post- Gruppe, als auch in der FTY 720 pre+ und post- Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Leukopenie erzeugt (Fig. 7).

In Bezug auf die absolute Neutrophilenanzahl im peripheren Blut nahm FTY 720 im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen Einfluss.

Somit konnte gezeigt werden, dass FTY 720 im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Leukopenie mit signifikanter Reduktion der Lymphozyten im peripheren Blut erzeugt, jedoch keine Reduktion der absoluten Neutrophilen im peripheren Blut hervorruft (Fig. 7 und 8).



**Fig. 7: Reduktion der Lymphozyten im peripheren Blut der FTY 720 post-Gruppe und der FTY 720 pre+ post- Gruppe nach 24h (\*p<0,05 vs. Kontrollgruppe)**

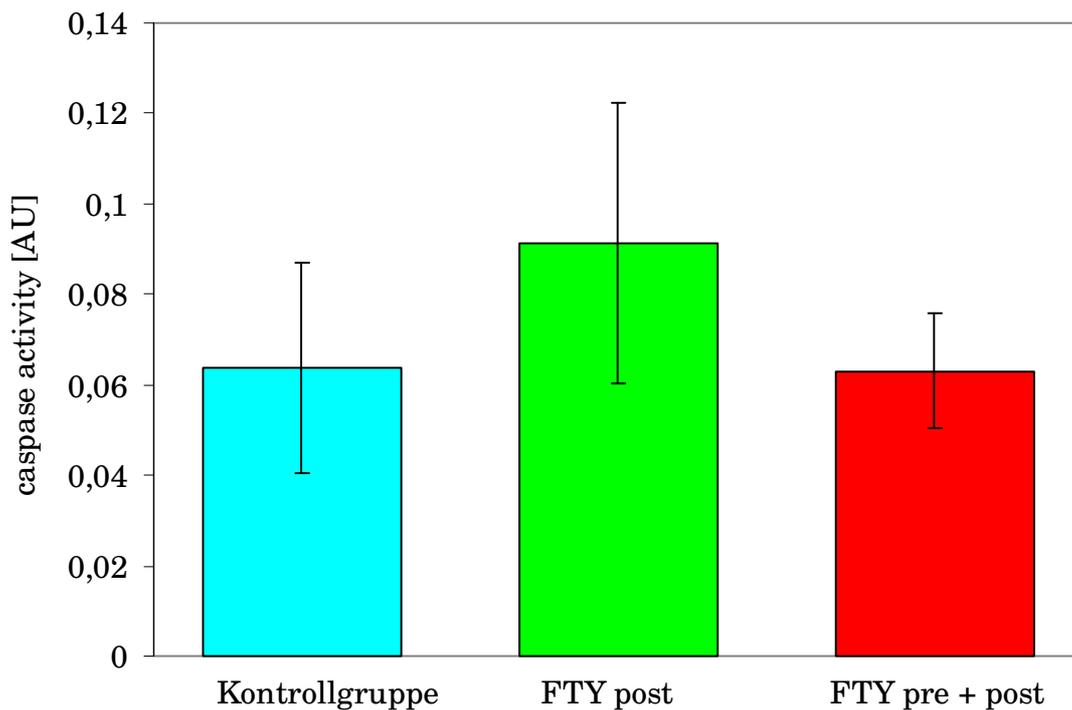


**Fig. 8: Keine Reduktion der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut durch die FTY Gabe, Reduktion der Lymphozyten im peripheren Blut der FTY 720 post- Gruppe und der FTY 720 pre+ post- Gruppe in Prozent (\*p<0,05 vs. Kontrollgruppe)**

### 3.4. Myokardiale Caspase 3 Aktivität

Die Caspase 3 Aktivität wurde sowohl in der Infarktzone als auch im intakten Myokardseptum aller 3 Gruppen untersucht.

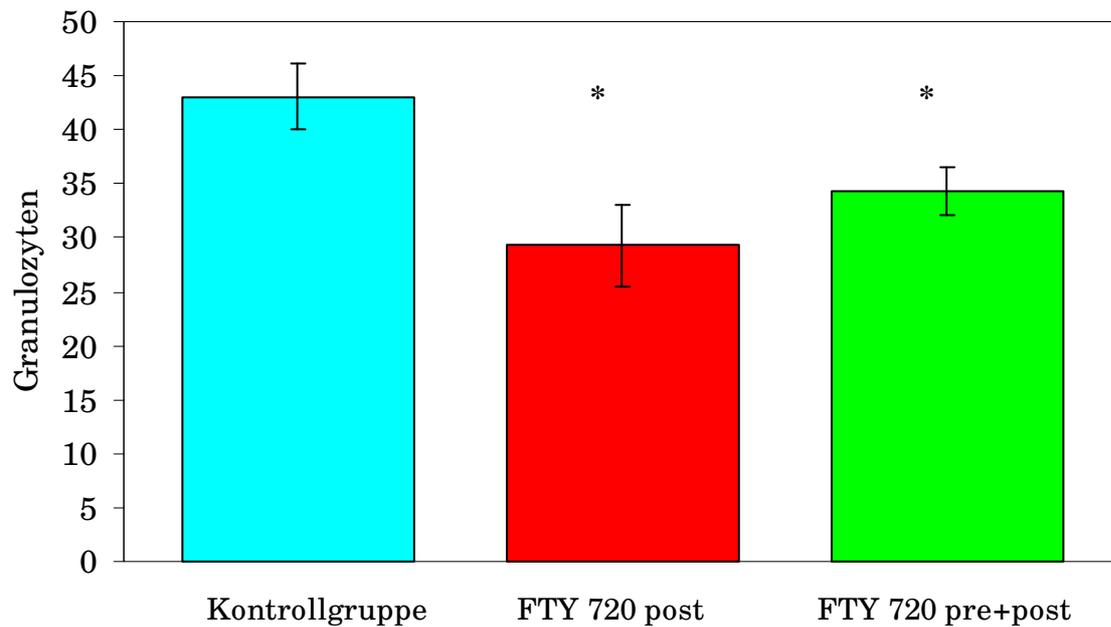
Die Behandlung mit FTY 720 hatte im Vergleich zur Kontrollgruppe weder in der FTY 720 post- Gruppe noch in der FTY 720 pre+ und post- Gruppe einen Effekt auf die Caspase 3 Aktivität in der Infarktzone und im intakten Myokardseptum (Fig. 9). Die Caspase 3 Aktivität in der Infarktzone und im intakten Myokardseptum bleibt somit trotz FTY 720- Behandlung unbeeinflusst und führt zur keiner signifikanten Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe.



**Fig.9:** Caspase 3 Aktivität in der Infarktzone und im Myokardseptum bleibt in allen 3 Gruppen annähernd unverändert. FTY 720-Behandlung führt daher zu keiner signifikanten Veränderung der Caspase 3 Aktivität weder in der Infarktzone noch im Myokardseptum.

### 3.5. Granulozyteninfiltration in der Infarkt Borderzone

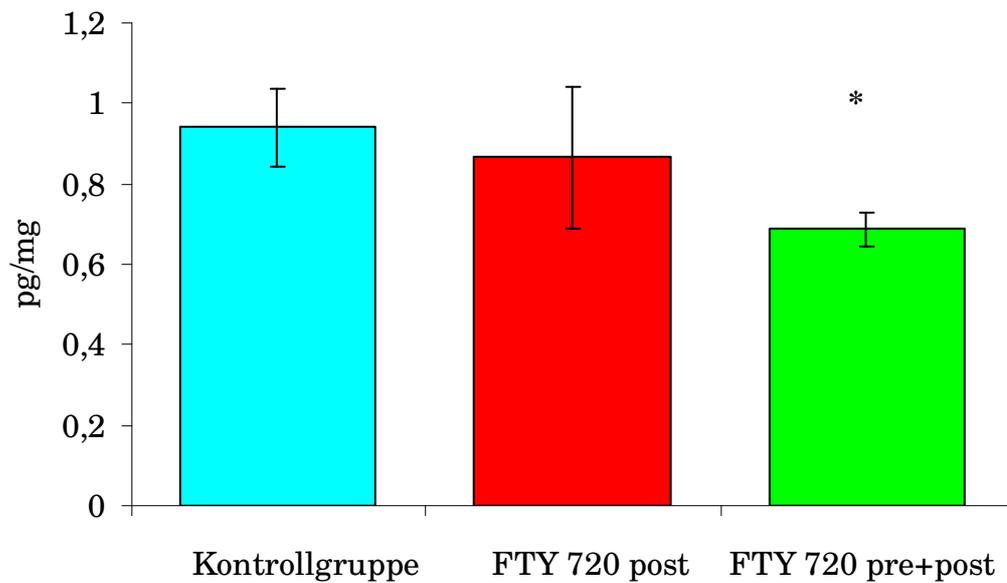
Es konnte gezeigt werden, dass FTY 720 eine signifikante Reduktion der Granulozyteninfiltration in der Infarkt Borderzone einen Tag nach der Infarzierung und Reperfusion herbeiführt (Fig. 10). Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich bei der Behandlung mit FTY 720 eine Reduktion der Granulozyteninfiltration in der Infarktzone. Sowohl in der FTY 720 post- Gruppe, als auch in der FTY 720 pre+ post- Gruppe kam es zu einer signifikanten Abnahme der Granulozytendichte einen Tag nach Infarzierung und Reperfusion (Fig. 10).



**Fig.10: Reduktion der Granulozyteninfiltration in der Infarkt Borderzone einen Tag nach Infarzierung und Reperfusion der FTY 720 post-Gruppe und der FTY 720 pre+ post- Gruppe (\*p<0,05 vs. Kontrollgruppe)**

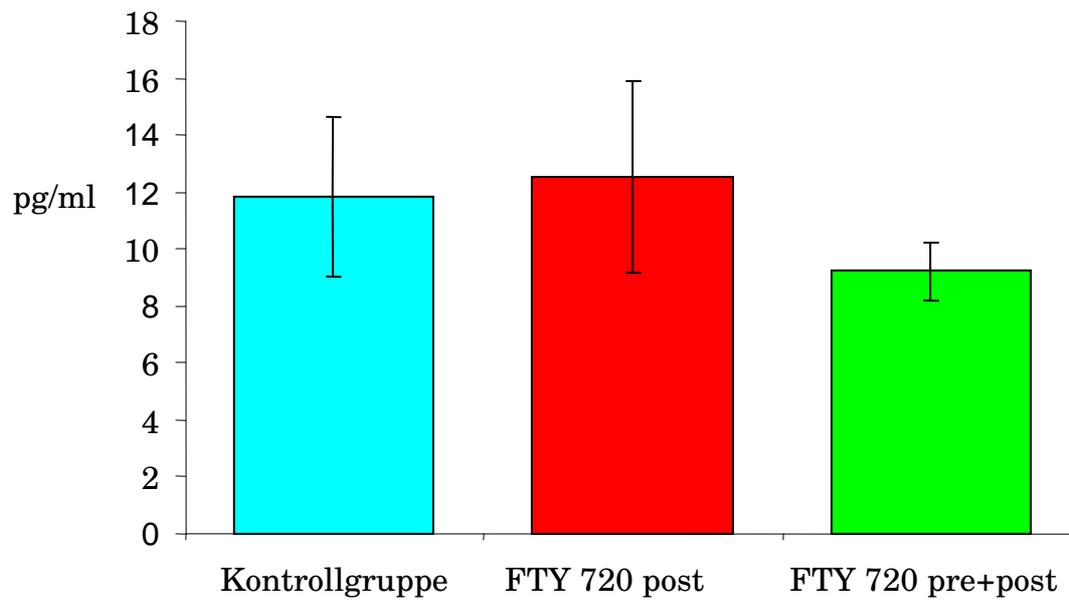
### **3.6. TNF- alpha- Konzentration im Infarkt und im Serum**

Die Gewebeproben der FTY 720 pre+ post- Gruppe wiesen im Gegensatz zur Kontrollgruppe und zur FTY 720 post- Gruppe eine signifikante Reduktion des TNF- alpha Proteins in der Infarkt Borderzone auf (Fig. 11).



**Fig. 11: Signifikante Reduktion des TNF- alpha Proteins in der Infarkt Borderzone der FTY 720 pre+ post- Gruppe (\* $p < 0,05$  vs. Kontrollgruppe)**

Das Serum aller 3 Tiergruppen wurde auf einen Unterschied der TNF- $\alpha$  Konzentrationen 24 h nach dem Reperfusionbeginn untersucht. Bei den mit FTY 720 behandelten Tieren zeigte sich keine signifikante Reduktion der TNF- $\alpha$  Konzentration im Serum. Somit reduziert FTY 720 nicht die Konzentration des TNF- $\alpha$  Proteins im Serum 24 h nach Reperfusionbeginn. (Fig. 12).



**Fig. 12:** Kein signifikanter Unterschied zwischen den Serum TNF- alpha Konzentration 24 h nach dem Reperfusionbeginn innerhalb der einzelnen Gruppen

## 4. Diskussion

In meiner Doktorarbeit testeten wir das therapeutische Potential des Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoragonisten (kurz: S1P-Agonisten) FTY 720 zur Reduktion des Ischämie/ Reperfusionsschaden anhand eines in vivo Ischämie/ Reperfusionsmodells an Rattenherzen. Dabei wurden 3 verschiedene Tiergruppen nach 45 minütiger Ligatur der linken Koronararterie und darauffolgender 24 stündiger Reperfusion hinsichtlich ihrer Infarktgröße untersucht. In allen 3 Gruppen wurden den Tieren analog zur pharmakologischen Postkonditionierung unmittelbar nach dem Setzen der Ligatur eine Substanz i. p. gespritzt: in der Kontrollgruppe war es NaCl, in den beiden anderen Gruppen FTY 720. Ziel war es die Hypothese zu prüfen, dass sich durch die Behandlung mit FTY 720 eine Reduktion der Infarktgröße erzielen lässt. FTY 720 war nicht in der Lage, die Infarktgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe zu reduzieren. Weder die Tiere, die mit FTY 720 nachbehandelt wurden (FTY 720 post- Gruppe), noch die Tiere, die sowohl 24 h vor Reperfusionsbeginn und nochmals kurz vor Reperfusionsbeginn mit FTY 720 behandelt wurden (FTY 720 pre+ post-Gruppe), zeigten einen signifikanten Einfluss auf die Infarktgröße.

Neben dem Parameter Infarktgröße wurden noch weitere Effekte von FTY 720 untersucht. Die Caspase 3 stellt einen wichtigen Apoptosemediator im Immunsystem dar [21]. Eine Reduktion der Caspase 3 Aktivität durch FTY 720 könnte zu einer Apoptosehemmung führen und sich damit günstig auf eine Infarktgrößenreduktion auswirken.

Es stellte sich jedoch heraus, dass die Behandlung mit FTY 720 weder in der FTY 720 post- Gruppe noch in der FTY 720 pre+ post- Gruppe einen Effekt auf die Caspase 3 Aktivität hatte. Die Caspase 3 Aktivität im Infarktgebiet der mit FTY 720 behandelten Tiere blieb unverändert. Analog zum fehlenden Effekt auf die Infarktgröße hatte FTY 720 demzufolge keinen Effekt auf die myokardiale Caspase 3 Aktivität.

FTY 720 beeinflusst möglicherweise die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und spielt eine Rolle in der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten [17]. Aus diesem Grund untersuchten wir die Auswirkungen von FTY 720 auf die Granulozytenzahl im Infarktgebiet. FTY 720 wies eine signifikante Reduktion der Granulozyteninfiltration in der Infarkttrandzone einen Tag nach der Infarzierung und Reperfusion auf. Demnach lies sich bestätigen, dass FTY 720 die Granulozyteninfiltration im Infarktgebiet senkt.

Weitere inflammatorische Effekte untersuchten wir anhand der Expression des proinflammatorischen Entzündungsmediators TNF- alpha. Der Nachweis dieses Proteins war für unsere Versuche aus dem Grund wichtig, weil in Studien gezeigt wurde, dass es zu kardialer Dysfunktion im Sinne einer Myokardkontraktilitätsminderung [22] sowie einer Apoptose der Myozyten führt [23], [24]. Demnach fördert TNF- alpha im ischämischen Myokard den Zelluntergang und behindert die Regeneration der Rattenherzmyozyten. Somit könnte TNF- alpha eine Vergrößerung der Infarktgröße auch bei unseren Tieren zu Folge haben. Hinsichtlich S1P hat man hier in Studien einen günstigen Effekt auf die Entzündung am Endothel herausfinden können. In in vivo Studien reduzierte sowohl S1P als auch der selektive S1P1-Agonist SEW 2871 die TNF- alpha getriggerte Entzündungszelladhäsion an das Endothel [25].

Eine Reduktion der lokalen TNF- alpha- Expresssion durch einen S1P-Agonisten, wie zum Beispiel FTY 720, könnte somit im Infarktgebiet den Reperfusionsschaden verringern.

Tatsächlich wiesen die Gewebeproben der FTY 720 pre+ post- Gruppe eine signifikante Reduktion des TNF- alpha Proteins in der Infarkt Borderzone im Vergleich zur Kontrollgruppe auf.

Somit bewirkte die Behandlung mit der Substanz den erwarteten Effekt auf die Lymphozytenzahl im peripheren Blut und reduzierte zudem die Granulozyteninfiltration und TNF- alpha Expression in der Infarkt Borderzone, ohne jedoch einen signifikanten Effekt auf den Ischämie/

Reperfusionsschaden (anhand Infarktgröße und Caspase 3 Aktivität gemessen) zu besitzen.

Trotz des mehrfachen experimentellen Beweises, dass S1P-Rezeptoren Schutz gegenüber Ischämie/ Reperfusionsschaden bei Kardiomyozyten vermitteln [20], [19], [2], [3], konnten unsere Experimente mit beiden Behandlungsregimen diesen Effekt nicht nachweisen. Stattdessen trat bei den mit FTY 720 behandelten Tieren eine signifikant erhöhte perioperative Sterblichkeit auf. Die erhöhte Sterblichkeit äußerte sich hauptsächlich in ventrikulären Tachyarrhythmien, Kammerflimmern und Bradykardien. Ähnliche kardiodepressive und proarrhythmische Effekte von S1P-Agonisten wie FTY 720 wurden schon früher ex vivo beobachtet [26], [27], [28].

In einer der Studien werden elektrophysiologische Einflüsse von FTY 720 auf Kardiomyozyten untersucht. Sie zeigen, dass FTY 720 einen einwärtsgerichteten Kaliumstrom in die Kardiomyozyten stimuliert [26]. Dieser Kaliumstrom führt zu einer Verkürzung des Aktionspotentials und Reduktion der Refraktärzeit am Herzen, was das Auftreten von Herzrhythmusstörungen mit gefährlichem Übergang in Kammerflimmern begünstigt. Dieser Mechanismus könnte das Auftreten von atrialen Herzrhythmusstörungen unter der Gabe eines S1P-Agonisten wie FTY 720 erklären.

Eine weitere Studie zeigte an isolierten Kaninchenherzen, dass S1P Sinustachykardien induziert und zu einer Vasokonstriktion in den Koronararterien der Kaninchen führt [27].

Weiterhin zeigte eine andere Studie, dass eine Stimulation von S1P1 Rezeptoren während hypoxischem Stress zu einem intrazellulären Überschuss an Kalziumionen in neonatalen Kardiomyozyten führt. Dieser Kalziumionenüberschuss hatte negativ inotrope und kardiotoxische Effekte zur Folge [28].

Aufgrund dieser zahlreichen Befunde ist davon auszugehen, dass am ehesten die Aktivierung von S1P1-Rezeptoren durch FTY 720 für die

gravierenden akuten proarrhythmischen Effekte am Myokard in Verbindung mit der akuten ischämischen Reperfusion steht.

Weil wir vermuteten, dass der proarrhythmische Effekt nur ein „first-dose-Effekt“ ist, unternahmen wir eine weitere Serie von Experimenten, in der die Ratten zweimal behandelt wurden, 24 h bevor und nochmals kurz vor Beginn der Reperfusion. Tatsächlich war diese Versuchsreihe nicht mit erhöhter Mortalität vergesellschaftet. Aber auch nach der zweimaligen Gabe von FTY 720 lies sich keine Reduktion der Infarktgröße nachweisen.

Mehrere Gründe können für den mangelnden Effekt hinsichtlich der angestrebten Infarktgrößenreduktion verantwortlich sein.

Zum einen könnte die Dosierung von FTY 720 eine Rolle spielen. Die meisten Studien, die einen nützlichen Effekt gegen renale Ischämie/ Reperfusionsschaden beweisen konnten, wendeten höhere Dosen an [30]. Es wurde FTY 720 in einer Dosis von 1mg/kg KG bei Sprague-Dawley-Ratten bei renalen Ischämie/ Reperfusionsmodellen angewendet [31]. Eine Dosissteigerung von FTY 720 hätte einen Effekt auf die Infarktgröße nehmen können. Andererseits kam es bereits in unseren Versuchen mit FTY 720 bei einer Dosierung von 0,5 mg/kg KG zu einer Übersterblichkeit wegen der ausgeprägten proarrhythmischen Effekte. Daher sahen wir es nicht als erfolgversprechend an, die Dosis von FTY 720 zu steigern.

Abgesehen von der richtigen Dosierung von FTY 720 könnte auch die Wahl eines günstigen Zeitpunkts bei der Applikation von FTY 720 die entscheidende Rolle für die Infarktgrößenreduktion spielen.

In unserem anfänglichen Protokoll wurde FTY 720 vor Reperfusionbeginn appliziert, damit sich die pharmakologische Wirkung von FTY 720 mit Reperfusionbeginn auf das reperfundierte Areal auswirken kann. Wie bereits erwähnt, vermuteten wir, dass der proarrhythmische Effekt nur ein „first-dose-Effekt“ ist. Um diesen Effekt zu umgehen, wurde FTY 720 zweimalig appliziert. In dieser weiteren Serie von Experimenten, wurden die Ratten zweimal behandelt, 24 h bevor und nochmal kurz vor Beginn der

Reperfusion. Tatsächlich war diese Versuchsreihe nicht mit erhöhter Mortalität vergesellschaftet.

Da sich auch bei diesen Versuchen trotz der zweimaligen Gabe von FTY 720 zu unterschiedlichen Zeitpunkten kein signifikanter Effekt auf die Infarktgrößenreduktion zeigte, scheint es keine Rolle zu spielen, wann FTY 720 appliziert wird. Die fehlende Infarktgrößenreduktion ist damit am ehesten unabhängig vom Applikationszeitpunkt.

Als weiteren Punkt möchte ich noch einmal auf die Bedeutung von TNF-alpha eingehen. Es wird unmittelbar nach dem Auftreten von myokardialer Ischämie heraufreguliert [23] und es rekrutiert speziell Entzündungszellen am Ort des verletzten Myokards [32]. Es steht direkt mit der Apoptoseinduktion von Kardiomyozyten in Verbindung [24]. Somit könnte sich eine Reduktion der Konzentration von TNF-alpha günstig auf das Infarktgebiet auswirken.

Neuere Studien bezüglich der Funktion von TNF-alpha im Infarktgebiet zeigen jedoch, dass TNF-alpha möglicherweise auch kardioprotektive Effekte auf akute Ischämie/ Reperfusion ausübt [33]. Daher wirkt sich die Verringerung der frühen proinflammatorische Zytokinexpression eventuell eher nachteilig für den Myokardschaden bei Infarkt aus.

In unseren Versuchen konnte mittels FTY 720 eine Reduktion von TNF-alpha in der Infarkt Borderzone erreicht werden. Die Infarktgröße blieb aber im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert. Da sich laut der neueren Studie TNF-alpha möglicherweise im Rahmen von Ischämie/ Reperfusion eher akut kardioprotektiv auswirkt [33], könnte die Herunterregulierung von TNF-alpha zu dem ausbleibenden Erfolg beigetragen haben. Dadurch, dass TNF-alpha vermindert vorhanden ist, fehlt die Kardioprotektion.

Bisher liegen nur wenige in vivo Studien bezüglich der Infarktgrößenreduktion mittels FTY 720 vor. FTY 720 wurde v. a. in ex vivo Modellen untersucht [6], [19]. Somit lässt sich nicht eindeutig der Grund für

den Misserfolg von FTY 720 bezüglich der Infarktgrößenreduktion im in vivo Modell feststellen.

Vielleicht liegt eine Ursache darin, dass TNF- alpha im in vivo Modell eine größere Rolle spielt. Anders als in ex vivo Modellen scheinen in in vivo Modellen, wie in unserem Ischämie/ Reperfusionsmodell, immunologische Effekte in Form von Inhibition oder Aktivierung inflammatorischer Mediatoren, wie zum Beispiel TNF- alpha, eine noch größere Bedeutung zu haben.

Neben diesen bisher ungeklärten unterschiedlichen immunologischen Effekten ist auch die Auswirkung von unterschiedlichen Lymphozytenpopulationen im akuten Ischämie/ Reperfusionsmodell noch nicht vollständig bestimmt worden. In unseren Versuchen ließ sich nachweisen, dass FTY 720 eine periphere Lymphozytopenie verursacht. Wir haben nicht die spezifischen Lymphozyten Untergruppen im peripheren Blut untersucht, aber der Antagonismus von S1P-Rezeptoren mag unterschiedliche Auswirkungen auf bestimmte Lymphozytenpopulationen ausüben [34].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Behandlung mit dem S1P-Agonisten FTY 720 trotz der antiinflammatorischen Wirkung keine Reduktion der Infarktgröße nach myokardialer Ischämie/ Reperfusion in vivo herbeiführt. Folglich scheint FTY 720 keine geeignete Substanz für die Nachbehandlung von Herzinfarkten zu sein. Trotz der vielversprechenden Effekte von S1P in ex vivo Modellen stellen insbesondere die proarrhythmischen Effekte auf die Elektrophysiologie der Kardiomyozyten und nach myokardialer Ischämie/ Reperfusion ein Hindernis für die klinische Anwendung dar.

## 5. Zusammenfassung

Einleitung: Mehrere ex vivo Studien zeigten zuletzt, dass Sphingosin-1-phosphate Schutz gegen myokardiale Ischämie/ Reperfusionsschaden verleihen [19], [20]. Der synthetische Sphingosin-1-phosphat-Rezeptoragonist FTY 720 war ebenso in der Lage, Entzündungsreaktionen in verschiedenen Krankheitsmodellen zu verringern [8]. Deshalb wollten wir die Hypothese prüfen, dass eine Behandlung mit FTY 720 zu einer Infarktgrößenreduktion nach myokardialer Ischämie/ Reperfusion in vivo führt.

Methode: In männlichen Wistar Ratten wurde myokardiale Ischämie dadurch induziert, dass wir die linke Koronararterie für 45 min mittels Fadenligatur verschlossen. Nach 24 h wurde die Infarktgröße bestimmt und die Granulozyteninfiltration im Infarktgebiet festgestellt. Caspase 3 Aktivität und TNF- alpha Konzentration im Myokardgewebe wurden durch ELISA ermittelt. FTY 720 wurde vor Beginn der Reperfusion i. p. appliziert oder 24 h vor Reperfusionsbeginn und nochmals direkt vor Reperfusionsbeginn.

Ergebnisse: Die einmalige Gabe von 0,5 mg/kg FTY 720 vor Reperfusion oder die zusätzliche Vorbehandlung der Tiere 24 Stunden vor der operativen Infarzierung reduzierte signifikant die periphere Lymphozytenanzahl. Sie nahm keinen Einfluss auf die Granulozytenanzahl im Blut. FTY 720 reduzierte die Granulozyteninfiltration und die TNF- alpha Konzentration der Borderzone. Es hatte aber keinen Effekt auf die myokardiale Caspase 3 Aktivität. Beide Behandlungsformen, weder die FTY 720- Gabe vor Reperfusionsbeginn noch die zweimalige FTY 720- Gabe waren in der Lage, Infarktgröße am Rattenherz zu reduzieren. FTY 720 erhöhte jedoch die Sterblichkeit der Ratten, wenn es einmalig vor Reperfusionsbeginn gegeben wurde, da es fatale myokardiale Arrhythmien induzierte.

Zusammenfassung: Trotz seines antiinflammatorischen Effektes bei einmaliger Gabe von FTY 720 wurde die Sterblichkeit der Tiere durch Arrhythmieinduktion erhöht. Beide Behandlungsregimes konnten die Infarktgröße nicht reduzieren.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Löwel H, Meisinger C, Heier M. et al.** Herzinfarkt und koronare Herzerkrankung in Süddeutschland, Ergebnisse der bevölkerungsbasierten MONICA/KORA- Herzinfarktregister 2001-2003. *Deutsches Ärzteblatt.* 103: B527-33, 2006
2. **Szwarc I, Soullier S, Gayrard N, Mejean C, Mourad G, Argiles A.** Ischemic postconditioning prevents ischemic acute renal failure. *Transplant Proc.* 39: 2554-6, 2007
3. **Iliodromitis EK, Lazou A, Kremastinos DT.** Ischemic preconditioning: protection against myocardial necrosis and apoptosis. *Vasc Health Risk Manag.* 3: 629-37, 2007
4. **Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Jiang R, Zatta AJ.** Myocardial protection in reperfusion with postconditioning. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 3: 1035-45, 2005
5. **Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J.** Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol,* 286: H477, 2004
6. **Hofmann U, Burkard N, Vogt C, Thoma A, Frantz S, Ertl G, Bonz A.** Protective effects of sphingosine-1-phosphate receptor agonist treatment after myocardial ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res.* 83: 285-93, 2009
7. **Huffmyer J, Raphael J.** Physiology and pharmacology of myocardial preconditioning and postconditioning. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* 13: 5-18, 2009
8. **Means CK, Xiao CY, Li Z, Zhang T, Omens JH, Ishii I, Chun J, Brown JH.** Sphingosine 1-Phosphate S1P2 and S1P3 receptor-mediated Akt-activation protects against in vivo myocardial ischemia-

- reperfusion injury. *AM J Physiol Heart Circ Physiol.* 292: H2944-51, 2007
9. **Gon Y, Wood MR, Kiosses WB, Jo E, Sanna MG, Chun J, Rosen H.** S1P3 receptor-induced reorganization of epithelial tight junctions compromises lung barrier integrity and is potentiated by TNF. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:9270-5, 2005
  10. **Spiegel S, Milstien S.** Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:397-407, 2003
  11. **An S, Goetzl EJ, Lee H.** Signaling mechanisms and molecular characteristics of G protein-coupled receptors for lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *J Cell Biochem Suppl.* 30-31:147-57, 1998
  12. **English D, Brindley DN, Spiegel S, Garcia JG.** Lipid mediators of angiogenesis and the signalling pathways they initiate. *Biochim Biophys Acta.* 1582:228-39, 2002
  13. **Dantas AP, Igarashi J, Michel T.** Sphingosine 1-phosphate and control of vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284:H2045-52, 2003
  14. **Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG.** Lymphocyte egress from thymus and peripheral organs is dependant on S1P receptor 1. *Nature.* 427:355-60, 2004
  15. **Brinkmann V.** FTY720: mechanism of action and potential benefit in organ transplantation. *Yonsei Med J.* 45:991-7, 2004
  16. **Chiba K.** FTY 720, a new class of immunomodulator , inhibits lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus by agonistic activity at S1P receptors. *Pharmacol. Ther.* 108:308-19, 2005
  17. **Dragun D, Böhler T, Nieminen-Kelhä M, Waiser J, Schneider W, Haller H, Luft FC, Budde K, Neumayer HH.** FTY 720-induced

- lymphocyte homing modulates posttransplant preservation/reperfusion injury. *Kidney Int.* 65:1076-83, 2004
18. **Chiba K, Matsuyuki H, Maeda Y, Sugahara K.** Role of sphingosine 1-phosphate receptor type 1 in lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus. *Cell Mol Immunol.* 3:11-9, 2006
  19. **Jin ZQ, Zhou HZ, Zhu P, Honbo N, Mochly-Rosen D, Messing RO, Goetzl EJ, Karliner JS, Gray MO.** Cardioprotection mediated by sphingosine-1-phosphate and ganglioside GM-1 in wild-type and PKC epsilon knockout mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 282:H1970-7, 2002
  20. **Theilmeier G, Schmidt C, Herrmann J, Keul P, Schäfers M, Herrgott I, Mersmann J, Larmann J, Hermann S, Stypmann J, Schober O, Hildebrand R, Schulz R, Heusch G, Haude M, von Wnuck Lipinski K, Herzog C, Schmitz M, Erbel R, Chun J, Levkau B.** High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor. *Circulation.* 114:1403-1409, 2006
  21. **Fernandes- Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES.** CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem.* 269:30761-4, 1994
  22. **Goldhaber JI, Kim KH, Natterson PD, Lawrence T, Yang P, Weiss JN.** Effects of TNF-alpha on  $[Ca^{2+}]_i$  and contractility in isolated adult rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 271:1449-55, 1996
  23. **Shames BD, Barton HH, Reznikov LL, Cairns CB, Banerjee A, Harken AH, Meng X.** Ischemia alone is sufficient to induce TNF-alpha mRNA and peptide in the myocardium. *Shock,* 17:114-9, 2002

24. **Krown KA, Page MT, Nguyen C, Zechner D, Gutierrez V, Comstock KL, Glembotski CC, Quintana PJ, Sabbadini RA.** Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest.* 98:2854-65, 1996
25. **Bolick DT, Srinivasan S, Kim KW, Hatley ME, Clemens JJ, Whetzel A, Ferger N, Macdonald TL, Davis MD, Tsao PS, Lynch KR, Hedrick CC.** Sphingosine-1-phosphate prevents tumor necrosis factor-alpha-mediated monocyte adhesion to aortic endothelium in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:976-981, 2005
26. **Ochi R, Momose Y, Oyama K, Giles WR.** Sphingosine 1-phosphate effects on guinea pig atrial myocytes: Alterations in action potentials and K<sup>+</sup> currents. *Cardiovasc Res.* 70:88-96, 2006
27. **Sugiyama A, Yatomi Y, Ozaki Y, Hashimoto K.** Sphingosine 1-phosphate induces sinus tachycardia and coronary vasoconstriction in the canine heart. *Cardiovasc Res.* 46:119-25, 2000
28. **Nakajima N, Cavalli AL, Biral D, Glembotski CC, McDonough PM, Ho PD, Betto R, Sandona D, Palade PT, Dettbarn CA, Klepper RE, Sabbadini RA.** Expression and characterization of Edg-1 receptors in rat cardiomyocytes: calcium deregulation in response to sphingosine 1-phosphate. *Eur J Biochem.* 267:5679-86, 2000
29. **Tsukada YT Sanna, MG Rosen, H Gottlieb RA.** S1P1 selective agonist SEW2871 exacerbates reperfusion arrhythmias. *J Cardiovasc. Pharmacol.* 50:660-9, 2007
30. **Awad AS, Ye H, Huang L, Li L, Foss FW Jr., Macdonald TL, Lynch KR, Okusa MD.** Selective sphingosine 1-phosphate 1 receptor activation reduces ischemia-reperfusion injury in mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 290:F1516-24, 2006

31. **Ortiz AM, Troncoso P, Kahan BD.** Prevention of renal ischemic reperfusion injury using FTY 720 and ICAM-1 antisense oligonucleotides. *Transplant Proc.* 35:1571-4, 2003
32. **Smith CW, Entman ML, Lane CL, Beaudet AL, Ty TI, Youker K, Hawkins HK, Anderson DC.** Adherence of neutrophils to canine cardiac myocytes in vitro is dependent on intercellular adhesion molecule-1. *J Clin Invest.* 88:1216-23, 1991
33. **Smith RM, Suleman N, McCarthy J, Sack MN.** Classic ischemic but not pharmacologic preconditioning is abrogated following genetic ablation of the TNF- alpha gene. *Cardiovasc Res.* 55:553-60, 2002
34. **Hofmann M, Brinkmann V, Zerwes HG.** FTY 720 preferentially depletes naive T-cells from peripheral and lymphoid organs. *Int Immunopharmacol.* 6:1902-10, 2006
35. **Frantz S, Calvillo L, Tillmanns J, Elbing I, Dienesch C, Bischoff H, Ertl G, Bauersachs J.** Repetitive postprandial hyperglycemia increases cardiac ischemia/ reperfusion injury: prevention by the alpha- glucosidase inhibitor acarbose. *FASEB J.* 19: 591-3, 2005



## **7. Danksagung**

Vielen Dank an meinen Doktorvater Herrn Priv. Doz. Dr. med. Andreas Bonz, der mir die Möglichkeit gab, diese Doktorarbeit machen zu dürfen.

Einen besonderen Dank geht an Herrn Dr. med. Ulrich Hofmann, der mich seit dem Beginn der Dissertation exzellent betreut und zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat. Ihm danke ich besonders dafür, dass er immer Zeit für Fragen und Korrekturen hatte.

Herrn Dr. Kai Hu danke ich recht herzlich für seine tatkräftige Unterstützung und sein Geschick bei den Tierversuchen.

Ganz besonders möchte ich unserer Medizinisch Technisch Angestellten Katharina Meder danken, die mich in das Bedienen labortechnischer Geräte und deren Anwendung sehr gut eingeführt hat.

Wir danken Dr. Obergfell vom Institut für klinische Biochemie und Pathobiochemie für die freundliche Hilfe bei der Auszählung unserer Differentialblutbildanalyse.

FTY 720 wurde liebenswürdigerweise von V. Brinkmann, Novartis Pharma Basel, Schweiz, bereitgestellt.

Meiner Familie danke ich recht herzlich für die Unterstützung und das Korrekturlesen der Arbeit.



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Walter  
Vorname: Franziska Claudia Elisabeth  
Geburtsdatum: 13.05.1983  
Geburtsort: Würzburg  
Familienstand: ledig  
Konfession: katholisch  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Schulbildung

Grundschule: Max-Dauthendey-Schule, Würzburg  
September 1989 bis April 1992  
Theodor-Heuss-Schule,  
Limburg a. d. Lahn  
April 1992 bis Juni 1993

Gymnasium: Private Marienschule  
Limburg a. d. Lahn  
Aug. 1993 bis Juni 2002

Abschluss: Abitur (Allgemeine Hochschulreife)  
(Note: 1,9) 2002

Qualifikationen: Oberstufe: Leistungskurse  
Mathematik sowie Französisch  
Latinum (Jahrgangsstufe 9 – 13)

## Berufserfahrung/ Praktika

Sozialpraktikum: St. Vincenz-Krankenhaus, Limburg  
Mai 1998,  
Chirurgie

Pflegepraktikum: St. Vincenz-Krankenhaus, Limburg  
Aug.- Okt 2002  
Chirurgie

April 2003: Beginn des Medizinstudiums an der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

8/9.3. 2005:	Physikum (Note: 2,5)
Sept 2005:	Chirurgische Famulatur St. Vincenz-Krankenhaus Limburg
März 2006:	Beginn der experimentellen Dissertation zum Thema „Pharmakologische Postkonditionierung des Sphingosin-1- Phosphat-Rezeptoragonisten FTY 720 im Ischämie/ Reperfusionsmodell am Rattenherz“
März 2006:	Dermatologische Famulatur in der Praxis Dr. med Eberhard Dielmann Limburg
Sept 2006:	Internistische Famulatur im Bereich Rheumatologie und Infektiologie Universitätsklinikum Würzburg
März 2007:	Anästhesiologische Famulatur im Reston Hospitalcenter USA
April 2007:	Pädiatrische Famulatur im Missionsärztlichen Klinikum Würzburg
Aug 2007:	Famulatur in der Hals-Nasen- Ohrenheilkunde Universitätsklinikum Würzburg
Oktober 2007:	Anästhesiologische Famulatur Heilig-Geist-Krankenhaus Köln
März 2001 bis April 2009:	Teilzeitbeschäftigung als Hilfskraft in der allgemeinchirurgischen Praxis Dr. med. Walter, Limburg

## **Praktisches Jahr**

25.2.2008-13.6.2008:	1. Tertial:	Chirurgie Spitalzentrum Biel Schweiz
16.6.2008-1.10.2008:	2. Tertial:	Innere Medizin Uniklinikum Pourtalès Neuchâtel Schweiz
6.10.2008-25.1.2009:	3. Tertial:	Dermatologie Universitätsklinikum Würzburg

## **Examen**

April – Juli 2009  
(Note: 2,5)

## **Sprachkenntnisse**

Französisch: fließend in Wort und Schrift  
Englisch: fließend in Wort und Schrift  
Latein: Latinum  
Italienisch: Grundkenntnisse  
Sowohl Teilnahme an vier Schüler-Austausch-Programmen in Frankreich, USA und Italien

## **EDV-Kenntnisse**

Microsoft Excel, Microsoft Word, Microsoft Power Point  
Einjähriger Informatikkurs mit Turbo Pascal

## **Freizeit**

Klavier zur Entspannung,  
aktives Mitglied im Tennisclub TC RW Limburg  
lesen, reisen und singen