

Aus dem Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung,  
W.G. Kerckhoff-Institut, Abteilung für Experimentelle Kardiologie, Bad Nauheim  
Eingereicht über das Institut für Veterinär-Anatomie, Histologie und Embryologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Die protektive Wirkung von Cyclosporin A  
während der Ischämie und der Reperfusion  
Untersuchungen am global  
ischämischen Hundeherzen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
**Lieven Pool**

Gießen 2002

Aus dem Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung,  
W.G. Kerckhoff-Institut, Abteilung für Experimentelle Kardiologie, Bad Nauheim  
Betreuerin: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Schaper

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Anatomie, Histologie und Embryologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. M. Kressin

# **Die protektive Wirkung von Cyclosporin A während der Ischämie und der Reperfusion Untersuchungen am global ischämischen Hundeherzen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
**Lieven Pool**  
Tierarzt aus Groningen (Niederlande)

Gießen 2002

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

---

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Schaper

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. M. Kressin

Tag der mündlichen Prüfung: 17.01.2002

*meinen Eltern, meinen Geschwistern und meiner Freundin Carolin*

# INHALTSVERZEICHNIS

	<b>Seite</b>
<b>I. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>II. LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>3</b>
<b>1. Ischämie</b>	<b>3</b>
1.1. Definition	3
1.2. Stoffwechsel	3
1.2.1. Energetischer Stoffwechsel des normalen Myokards	3
1.2.2. Energetischer Stoffwechsel während der Ischämie	3
1.2.3. Osmolarität während der Ischämie	4
1.3. Reversible und irreversible Schädigung	4
1.4. Ultrastrukturelle Veränderungen während der Ischämie	5
<b>2. Reperfusion</b>	<b>6</b>
2.1. Definition	6
2.2. Stoffwechsel	6
2.2.1. Energetischer Stoffwechsel während der Reperfusion	6
2.2.2. Osmolarität während der Reperfusion	6
2.3. Ultrastrukturelle Veränderungen während der Reperfusion	7
2.4. „Myokardial Stunning“	7
2.5. Reperfusionsschäden	8
<b>3. Apoptose</b>	<b>8</b>
3.1. Definition und Vorkommen	8
3.2. Ablauf und Morphologie	9
3.3. Nachweis der Apoptose	10
3.3.1. Nachweis der morphologischen Merkmale	10
3.3.2. Nachweis der biochemischen Merkmale	10

	<b>Seite</b>
<b>4. Nekrose</b>	<b>11</b>
4.1. Definition	11
4.2. Ablauf und Morphologie	11
4.3. Histologischer Nachweis der Nekrose	12
<b>5. Apoptose-relevante Proteine</b>	<b>12</b>
5.1. Bcl-2 Familie	12
5.1.1. Bcl-2 Protein	13
5.1.2. Bax-Protein	13
5.2. Cytochrom C	14
<b>6. Mitochondrien und mitochondriale „permeability transition“</b>	<b>15</b>
6.1. Aufbau und Aufgaben der Mitochondrien	15
6.2. Aufbau und Regulation der „permeability transition“-Pore (PTP)	16
<b>7. Cyclosporin A</b>	<b>18</b>
<b>8. Calcineurin</b>	<b>19</b>
<b>III. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>21</b>
<b>1. Tiermodell</b>	<b>21</b>
1.1. Material	21
1.1.1. Versuchstiere	21
1.2. Methoden	21
1.2.1. Prämedikation und Narkose	21
1.2.2. Operationstechnik	22
1.2.2.1. Entnahme des Herzens	22
1.2.2.2. Aufbewahrung des Herzens	23
1.2.2.3. Reperfusion des Herzens	23
1.2.2.4. Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls	25
1.2.2.5. Probenentnahme	25

	<b>Seite</b>
<b>2. ATP-Analyse</b>	<b>26</b>
<b>3. Funktionsmessungen</b>	<b>26</b>
3.1. Material	27
3.2. Methoden	27
<b>4. Elektronenmikroskopie</b>	<b>27</b>
4.1. Material	28
4.1.1. Gewebe	28
4.1.2. Verbrauchsmaterialien	28
4.1.3. Geräte	28
4.2. Methoden	28
4.2.1. Probenvorbereitung	28
4.2.2. Elektronenmikroskopische Auswertung	29
<b>5. Immunhistochemie</b>	<b>30</b>
5.1. Material	30
5.1.1. Gewebe	30
5.1.2. Antikörper	30
5.1.2.1. Primäre Antikörper	30
5.1.2.2. Sekundäre Antikörper	30
5.1.2.3. Detektionssystem	31
5.1.3. Phalloidin	31
5.1.4. Kernfarbstoffe	31
5.1.5. Verbrauchsmaterialien	32
5.1.6. Mikroskope	32
5.2. Methoden	33
5.2.1. Herstellung der beschichteten Objektträger	33
5.2.2. Herstellung der Gefrierschnitte	33
5.2.3. Färbeprotokoll	34
5.2.4. Quantifizierung der Lamin-B1/A-positiven Myozytenkerne	35
5.2.5. Konfokale Lasermikroskopie	35

	<b>Seite</b>
<b>6. TUNEL-Methode</b>	<b>36</b>
6.1. Material	36
6.1.1. Gewebe	36
6.1.2. Kit	36
6.2. Methode	37
6.2.1. Arbeitsprotokoll der TUNEL-Methode	37
6.2.2. Quantifizierung der TUNEL-positiven Myozytenkerne	39
6.2.3. Konfokale Mikroskopie	40
<b>7. Western Blot</b>	<b>40</b>
7.1. Probenvorbereitung	40
7.1.1. Material	40
7.1.1.1. Gewebe	40
7.1.1.2. Verbrauchsmaterialien	40
7.1.2. Methode	41
7.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	42
7.2.1. Material	42
7.2.2. Methode	42
7.3. Arbeitsprotokolle	43
7.4. SDS-Gelelektrophorese	43
7.4.1. Material	44
7.4.1.1. Puffer	44
7.4.1.2. Gele	44
7.4.1.3. Geräte	44
7.4.2. Methode	44
7.5. Proteintransfer	45
7.5.1. Material	45
7.5.1.1. Puffer	45
7.5.1.2. Membranen	45
7.5.2. Methode	45

	<b>Seite</b>
7.6. Proteinnachweis	46
7.6.1. Material	46
7.6.2. Methode	46
7.7. Immunologische Darstellung der Proteine	47
7.7.1. Material	47
7.7.1.1. Primäre Antikörper	47
7.7.1.2. Sekundäre Antikörper	48
7.7.1.3. Detektionssystem	48
7.7.1.4. Verbrauchsmaterialien	48
7.7.1.5. Geräte	48
7.7.2. Methode	49
7.7.2.1. Immunologischer Nachweis der Proteine	49
7.7.2.2. Quantifikation und Dokumentation der Western Blots	50
7.7.2.3. „Strippen“ der Membranen	50
<b>8. Analyse der Calcineurinaktivität</b>	<b>50</b>
8.1. Material	50
8.1.1. Gewebe	50
8.1.2. Kit	50
8.1.3. Verbrauchsmaterialien	51
8.1.4. Geräte	52
8.2. Methode	52
8.2.1. Probenvorbereitung und Bestimmung der Proteinkonzentration	52
8.2.2. Radioaktive Phosphorylierung des Myelin-Basic-Proteins	52
8.2.3. Messung der Calcineurinaktivität	52
<b>9. Auswertung und Statistik</b>	<b>52</b>
<b>IV. ERGEBNISSE</b>	<b>55</b>
<b>1. Funktionelle Erholung</b>	<b>55</b>
<b>2. Gehalt an Adenin-Tri-Phosphat (ATP)</b>	<b>56</b>

	<b>Seite</b>
<b>3. Elektronenmikroskopie (EM)</b>	<b>57</b>
3.1. Grad der ischämischen Schädigung	57
3.2. Apoptose und Nekrose	61
<b>4. TUNEL-positive Myozyten</b>	<b>61</b>
<b>5. Immunhistochemie</b>	<b>63</b>
5.1. Lamine	64
5.1.1. Lamin B1	64
5.1.2. Lamin A	66
5.2. Sarkomere Proteine	68
5.2.1. Alpha-Aktinin	68
5.2.2. Aktin	70
5.3. Complement C9	70
<b>6. Western Blot</b>	<b>70</b>
6.1. Sarkomere Proteine	71
6.1.1. Alpha-Aktinin	71
6.1.2. Aktin	71
6.2. Calcineurin	72
6.3. Apoptose-relevante Proteine	72
6.3.1. Cytochrom C	73
6.3.1.1. Partikuläre Fraktion	73
6.3.1.2. Zytoplasmatische Fraktion	74
6.3.1.3. Gemischte Fraktion	75
6.3.2. Bax	75
6.3.3. Bcl-2	76
<b>7. Calcineurinaktivität</b>	<b>77</b>
<b>8. Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	<b>78</b>

	<b>Seite</b>
<b>V. DISKUSSION</b>	<b>81</b>
<b>1. Versuchsprotokoll</b>	<b>81</b>
1.1. Tiermodell	81
1.2. Hypothermie	81
1.3. Kardioplegie	82
<b>2. Ischämie und Reperfusion</b>	<b>84</b>
<b>3. Apoptose und Nekrose</b>	<b>89</b>
3.1. Nachweis und Bedeutung der Nekrose im Tiermodell	89
3.2. Nachweis und Bedeutung der Apoptose im Tiermodell	90
<b>4. Regulation und Hemmung der Apoptose</b>	<b>93</b>
4.1. Auslöser und übergeordnete Mechanismen der Apoptose	93
4.2. Mechanismus und Hemmung der Cytochrom C bedingten Apoptose	94
<b>5. Mechanismen der Apoptoseregulation durch die Bcl-2 Proteinfamilie</b>	<b>97</b>
5.1. Anti-oxidative Effekte	97
5.2. Sequestration von Apaf-1	98
5.3. Mitochondriengekoppelte Wirkungsmechanismen	98
5.3.1. Regulierung der mitochondrialen „permeability transition“- Pore	99
5.3.2. Porenbildende Eigenschaft der Bcl-2-Familie	100
5.4. Bedeutung von Bcl-2 und Bax im beschriebenen Modell	101
<b>6. Mechanismus und Hemmung der Calcineurin-bedingten Apoptose</b>	<b>102</b>
<b>7. Schlussfolgerung und Zukunftsperspektiven</b>	<b>104</b>
<b>VI. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>107</b>

	<b>Seite</b>
<b>VII. SUMMARY</b>	<b>109</b>
<b>VIII. ABKÜRZUNGEN</b>	<b>111</b>
<b>IX. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>113</b>
<b>X. DANKSAGUNG</b>	<b>137</b>

## I. EINLEITUNG

Geschichtlich begannen die Herztransplantationen mit den Experimenten von Carrel<sup>1</sup> und Guthrie<sup>2</sup> zu Anfang des 20. Jahrhunderts. Diese Experimente wurden in den darauffolgenden Jahrzehnten häufig modifiziert, wobei vor allem die Arbeiten von Mann et al.<sup>3</sup> und Bing et al. wichtige Erkenntnisse hervorbrachten. Mitte der 60iger konnten Shumway et al. schließlich erste Erfolge bei der Transplantation von Hundeherzen vorweisen<sup>4-6</sup>.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Versuche führte Barnard<sup>7</sup> am 3. Dezember 1967 die erste Transplantation beim Menschen durch. Dabei wurde der Erfolg des Eingriffs erst durch die Entwicklung der Herzlungenmaschine sowie die Anwendung spezieller chirurgischer Methoden ermöglicht. Ermutigt durch die Veröffentlichung von Barnard wurden bis zum Jahre 1978 379 weitere Herzen transplantiert<sup>8</sup>.

Allerdings lag die Überlebensrate nach fünf Jahren nur bei 31%, wobei die meisten Patienten an Infektionen (56%) und Abstoßungsreaktionen (21%) starben<sup>8</sup>. Mittlerweile haben einerseits die Behandlung mit neuen Antibiotika und wirkungsvollere Desinfektionsmaßnahmen die Bekämpfung der Infektionserreger verbessert. Andererseits führte die Einführung von Cyclosporin A (CsA) zur Immunsuppression zu einer drastischen Senkung der Abstoßungsreaktionen.

Neben den beschriebenen post-operativen Problemen spielt vor allem die „intercorporale“ Aufbewahrung der Organe eine herausragende Rolle bei Herztransplantationen. Diesbezüglich berichteten Stinson et al.<sup>4</sup> schon 1969 von einer signifikanten Verbesserung der funktionellen Erholung nach Aufbewahrung der Herzen in kalter NaCl-Lösung bei 6 bis 10°C. Außerdem empfahl Melrose<sup>9</sup> eine kardioplegische Lösung, deren hohe Kaliumkonzentration zu einem vollständigen diastolischen Herzstillstand führt. Seitdem wurde die Zusammensetzung der kardioplegischen Lösung vielfach modifiziert, wobei insbesondere die von Bretschneider<sup>10</sup> beschriebene Lösung in vielen Kliniken eingesetzt wurde.

Heutzutage gilt eine 4stündige Aufbewahrung trotz der Kombination aus Hypothermie und Kardioplegie als limitierende Zeitspanne für eine einwandfreie funktionelle Erholung nach der Transplantation<sup>11</sup>. Überschreitet die Aufbewahrung dieses Zeitlimit, steigt die Morbidität und Mortalität der Organempfänger.

Da die Herzen innerhalb dieser Zeitspanne vom Spender zum Empfänger transportiert werden müssen, hätte eine verbesserte Langzeit-Aufbewahrung eine deutliche Vergrößerung des Spenderpools zur Folge.

Diesbezüglich konnten Nazareth et al.<sup>12</sup> und Griffiths et al.<sup>13</sup> die protektive Wirkung von Cyclosporin A auf ischämische Kardiomyozyten nachweisen. Während der Erstgenannte die Effekte *in vitro* an Rattenkardiomyozyten untersuchte, erkannte Griffiths die Eigenschaft bei seinen Versuchen an isolierten Rattenherzen (maximal 45 Minuten Ischämie).

In der vorliegenden Studie sollte geklärt werden, ob diese protektiven Effekte auch *in vivo* bei der globalen Langzeitischämie von Hundeherzen auftreten. Dazu wurden die Herzen entnommen und 18 Stunden in CsA-angereicherter „University of Wisconsin“-Lösung gelagert, bevor sie an ein Empfängertier angeschlossen und sechs Stunden reperfundiert wurden. Außerdem sollte in der Arbeit erforscht werden, wie CsA das Myokard während der Ischämie schützt. Gleichzeitig liefern die Ergebnisse der Kontrollgruppe Hinweise auf die Wirkung der „University of Wisconsin“-Lösung, da diese ursprünglich für Pankreastransplantationen<sup>14</sup> entwickelte Lösung auch bei Herztransplantationen viele Vorteile bietet<sup>15</sup>.

In Bezug auf die Wirkungsmechanismen sollte bei der vorliegenden Arbeit, insbesondere die Rolle des apoptotischen Zelltodes sowie die Bedeutung der Mitochondrien untersucht werden.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Ischämie

#### 1.1. Definition

Der Zustand, in dem der reduzierte arterielle Blutfluss das Myokard nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt, um einen metabolischen Wechsel von aerobem zu anaerobem Stoffwechsel zu verhindern, wird als myokardiale Ischämie bezeichnet <sup>16</sup>.

Entsprechend wird die totale Ischämie als vollständige Abwesenheit des arteriellen Blutflusses definiert <sup>17</sup>. Bezieht sich die totale Ischämie wie in unserem Tiermodell auf das ganze Herz wird von globaler Ischämie gesprochen.

#### 1.2. Stoffwechsel

##### 1.2.1. Energetischer Stoffwechsel des normalen Myokards

Unter physiologischen Bedingungen wird die Energie in den Herzmuskelzellen über aerobe Stoffwechselfvorgänge gewonnen <sup>18</sup>, wobei Glukose und Fettsäuren in den Mitochondrien oxidativ abgebaut werden <sup>19</sup>. Die bei der Oxidation freiwerdende Energie dient der Synthese von ATP aus ADP und Phosphat. Im weiteren Verlauf wird das ATP über den „Kreatin-Phosphat-Shuttle“ in die Peripherie der Zelle transportiert und dort verbraucht <sup>20</sup>.

##### 1.2.2. Energetischer Stoffwechsel während der Ischämie

Schon 15 bis 20 Sekunden nach Versiegen der Sauerstoffzufuhr wechselt die Herzmuskelzelle von aerober Glukose-Oxidation zu anaerober Glykolyse <sup>21</sup>. Dabei wird die aus Glykogen gewonnene Glukose in Abwesenheit von Sauerstoff zu Laktat abgebaut. Die Folge ist eine Vervierfachung der Laktatkonzentration und ein drastischer Abfall des intrazellulären pH's innerhalb der ersten Minute <sup>22</sup>. Dieser Abfall hemmt in Kombination mit einer gleichzeitigen Erhöhung der NADH<sub>2</sub>/NAD-Rate die für die anaerobe Glykolyse essentielle Phospho-Glycerinaldehyd-Dehydrogenase <sup>23,24</sup>.

Trotz der schnellen Umstellung und der gleichzeitigen Blockade der Myofibrillenkontraktionen <sup>18,25</sup> reicht das gebildete ATP nicht aus, um den Energiebedarf der ischämischen Zelle zu decken. Dieser Bedarf setzt sich primär aus dem Verbrauch der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, der Ca<sup>2+</sup>-ATPase und der „reverse“

arbeitenden mitochondrialen ATPase<sup>26</sup> zusammen. Um das entstehende Defizit auszugleichen, bauen die Zellen ihren Vorrat an ATP über das zwischenzeitlich gebildete ADP, AMP und Adenosin zu Inosin ab<sup>25</sup>. Dies führt zu einer Halbierung der Adenin-Nukleotide nach 15 Minuten sowie nach 40 minütiger Ischämie zu einer Verringerung der zellulären ATP-Konzentration auf 10%<sup>18</sup>. Überschreitet die Ischämie eine kritische Dauer, ist der Vorrat an Adenin-Nukleotiden aufgebraucht, gefolgt von einer vollständigen Hemmung der anaeroben Glykolyse<sup>16</sup>.

### 1.2.3. Osmolarität während der Ischämie

Die beschriebenen Vorgänge der Energiegewinnung führen zu einer Ansammlung von metabolischen Endprodukten in den betroffenen Zellen. In diesem Zusammenhang entstehen vor allem beim Abbau von Kreatin-Phosphat, ATP und osmotisch inaktivem Glykogen eine Vielzahl osmotisch aktiver Zwischen- und Endprodukte (z.B. Laktat)<sup>16</sup>.

Aber auch die Veränderungen der Ionengleichgewichte spielen eine bedeutende Rolle bei der Einstellung der ischämischen Osmolarität. Kurz nach Beginn der Ischämie setzt ein starker Efflux der K<sup>+</sup>-Ionen ein. Hierbei steigt die extrazelluläre K<sup>+</sup>-Konzentration im ischämischen Schweineherzmuskel nach Okklusion der linken Koronararterie innerhalb von 2 Minuten auf 10 mM und sistiert auf diesem Level<sup>27</sup>. Währenddessen bleibt die intrazelluläre Na<sup>+</sup>-Konzentration sehr lange konstant, da die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase während der ersten 15 Minuten der Ischämie aktiv bleibt<sup>28</sup>. Im Gegensatz dazu zeigt die Ca<sup>2+</sup>-Ionenkonzentration während der Ischämie einen deutlichen Anstieg<sup>29</sup>. Dabei werden die intrazellulär vermehrt vorhandenen H<sup>+</sup>-Ionen mittels Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauschern aus der Zelle entfernt. Die über diesen Mechanismus eingeflossenen Na<sup>+</sup>-Ionen aktivieren anschließend die Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher.

Schließlich gipfelt der konstante Konzentrationsanstieg der intrazellulären Ionen und Moleküle in einer Osmolarität von 100-120 mosmols/l nach 120minütiger Ischämie<sup>30</sup>. Das zum osmotischen Ausgleich einfließende Wasser führt zu einer Schwellung der Herzmuskelzellen und zu einer Belastung des Sarkolemm. Hinzu kommen weitere Schäden, durch die Aktivierung Ca<sup>2+</sup>-sensitiver Phospholipasen und Proteasen<sup>31</sup>.

### 1.3. Reversible und irreversible Schädigung

Am Anfang der Ischämie ist die Schädigung der Myozyten reversibel, d.h. sämtliche während der Ischämie aufgetretenen Veränderungen können durch Reperfusion des Gewebes rückgängig gemacht werden. Diese Art der Schädigung lässt sich in

verschiedene Grade einteilen, wobei ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Dauer der Ischämie und der Schwere der Schädigung festgestellt werden kann.

Im Gegensatz dazu erholt sich irreversibel geschädigtes Myokard auch nach längerer Reperfusion weder metabolisch noch strukturell<sup>10</sup>. Der Übergang von reversibler zu irreversibler Schädigung wird maßgeblich durch Zerstörung der Zellmembran erreicht<sup>32,33</sup>. Diese entsteht durch einen Zweistufen-Mechanismus, bestehend aus einer Verringerung der Zellmembranintegrität und einer mechanischen Belastung. Dabei wird die Membranintegrität durch eine Vielzahl von Einflüssen, wie zum Beispiel die Verdauung der Zytoskelett-Membran-Verbindungen<sup>34</sup> und der Membranphospholipide<sup>35</sup>, geschwächt. Gleichzeitig führt das massive Einfließen von Ionen zu einer Schwellung der Zellen und anschließend zur Ruptur der Membran<sup>36</sup>. Infolge dessen stirbt die Zelle beim Ausgleich zwischen intra- und extrazellulärem Milieu. Außerdem führt die Zerstörung der Zellmembran zum Verlust an ATP, zur Hemmung der Glykolyse und zur Akkumulation von Kataboliten<sup>18</sup>.

Als Indikatoren für irreversibel geschädigtes Myokard dienen die eindeutigen ultrastrukturellen Veränderungen der Mitochondrien und des Sarkolemm. Des Weiteren finden sich jeweils minimale ATP- und Glykogen-Konzentrationen sowie stark erhöhte Laktat-, Protonen-, AMP- und Inosin-Werte.

#### **1.4. Ultrastrukturelle Veränderungen während der Ischämie**

Da die Mitochondrien, als zentrale Maschinerie des zellulären Metabolismus, besonders empfindlich auf die Ischämie reagieren, zeigen sie die ersten Veränderungen<sup>37</sup>. Nach Auflösung der Granula führt die Schwellung der Organellen zu einer Aufhellung der Matrix und zur Fragmentierung der Cristae. Diese Veränderungen verschlimmern sich mit der Dauer der Ischämie und im Stadium der irreversiblen Schädigung können die elektronendichten, unlösbaren „flocculent densities“ nachgewiesen werden.

Später als die Mitochondrien schwellen die Kerne auffällig an, gefolgt von einer Verklumpung des Chromatins. Weitere typische Anzeichen der Ischämie sind die Relaxation der Myofibrillen, die Auflösungserscheinungen der Z-Bande, das Verschwinden der Glykogenvorräte und die oben beschriebenen Zerstörungen am Sarkolemm. Dabei korreliert bei allen Organellen der Grad der Schädigung mit der Dauer der Ischämie.

Um eine bessere Beurteilung des Gewebes zu ermöglichen, haben Schaper et al.<sup>10,37,38</sup> die gefundenen Veränderungen ausführlich beschrieben und

entsprechend der Tabelle (siehe Kapitel IV, Punkt 3.1) in Schädigungsgrade eingeteilt.

## **2. Reperfusion**

### **2.1. Definition**

Unter Reperfusion versteht man die Wiederherstellung des arteriellen Blutflusses nach der Ischämie. In unserem Modell wird dies durch das Anschliessen der Spenderherzen an den Blutkreislauf der Empfängertiere erreicht.

### **2.2. Stoffwechsel**

#### **2.2.1. Energetischer Stoffwechsel während der Reperfusion**

Die erneute Sauerstoffversorgung des Gewebes reaktiviert die oxidative Phosphorylierung in den reversibel geschädigten Myozyten. Innerhalb von drei Minuten rephosphorylieren die Mitochondrien das im Gewebe akkumulierte AMP und ADP zu ATP<sup>39</sup>. Allerdings dauert es bis zu vier Tage, um den während der Ischämie signifikant verringerten Adenosin-Nukleotid-Pool wieder vollständig aufzubauen. Der Grund ist die langsame Synthese der Adenosin-Vorläufer im Myokard<sup>40</sup>.

#### **2.2.2. Osmolarität während der Reperfusion**

Die im reversibel geschädigten Myokard angesammelten Metaboliten werden durch das zirkulierende Blut ausgewaschen oder zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O metabolisiert. Des weiteren steigt die intrazelluläre K<sup>+</sup>-Konzentration schnell wieder auf den Ausgangswert an<sup>39</sup>. Dagegen konnten Tani et al.<sup>41</sup> und Whalen et al.<sup>42</sup> erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen im reversibel geschädigten Gewebe messen. Allerdings ist bisher ungeklärt, warum die intrazellulären Ödeme noch Stunden nach Beginn der Reperfusion persistieren.

Im Gegensatz dazu ist die Reperfusion des irreversibel geschädigten Myokards durch eine explosionsartige Schwellung der Zellen gekennzeichnet<sup>42</sup>. Gleichzeitig strömen Ca<sup>2+</sup>-Ionen durch die defekte Zellmembran in die Zellen<sup>43</sup>. Dort lagern sie sich innerhalb weniger Sekunden in den Mitochondrien ein und führen zur Kontraktion der Myofibrillen mit nachfolgender Nekrose<sup>44</sup>. Weitere Ursachen für den schnellen Zelltod der irreversibel geschädigten Myozyten während der

Reperfusion sind das schnelle Einfließen von Na<sup>+</sup>-, Cl<sup>-</sup>- und Phosphat-Ionen sowie das Auswaschen der Enzyme und K<sup>+</sup>-Ionen durch den reaktivierten Blutfluss.

### 2.3. Ultrastruktur des reperfundierten Myokards

Entsprechend der Ischämie spielen die charakteristischen Veränderungen der Mitochondrien auch bei der Reperfusion eine wichtige Rolle bei der Beurteilung des Gewebes. Sie sind zu Beginn der Reperfusion meist stark geschwollen und aufgeheilt. Außerdem führt die Schwellung in vielen Fällen zu einer Fragmentierung der Cristae. Allerdings zeigen die reversibel geschädigten Zellen eine deutliche Erholung im Laufe der Reperfusion. Diesbezüglich berichteten Jennings et al.<sup>39</sup>, dass sich Herzzellen nach einer 15minütigen Ischämie innerhalb von 20 Minuten erholen. Obwohl die Mitochondrien nach 3minütiger Reperfusion etwas geschwollen waren, konnten die Wissenschaftler nach 20 Minuten kaum ultrastrukturelle Veränderungen nachweisen. Die Mitochondrien entsprachen der Kontrolle, das Chromatin in den Zellkernen war gleichmäßig verteilt und die Glykogenvorräte waren aufgefüllt. Nur vereinzelt vorliegende geschwollene Mitochondrien zeugten von der Ischämie.

### 2.4. „Myocardial Stunning“

„Myocardial stunning“ beschreibt den Zustand der anhaltenden Dysfunktion während der Reperfusion<sup>45</sup>. Dabei benötigt das Herz abhängig von Schwere und Dauer der Ischämie mehrere Tage, bis sich die kontraktile Funktion des Myokards vollständig erholt hat. Als Ursache des Phänomens werden unter anderem folgende zellulären Mechanismen diskutiert: A) Störungen der Calciumhomeostase, B) Anstieg der freien Radikale und C) Schäden am kontraktilem Apparat.

Eine andere Hypothese, die die geringe Verfügbarkeit von ATP in den Myofibrillen für die Dysfunktion verantwortlich macht, konnte mittlerweile durch die Untersuchungen von Reimer et al.<sup>20</sup> widerlegt werden. Für die Störungen der Calciumhomeostase als Ursache sprechen die Ergebnisse von Boli et al.<sup>46</sup>, wobei das „myocardiale stunning“ mittels hypocalcämischer Reperfusion gehemmt werden konnte. Ähnliche Resultate ergeben die von Boli et al.<sup>47</sup> durchgeführten Versuche mit Radikalfängern. Hierbei zeigte das Myokard eine beschleunigte funktionelle Erholung nach der Neutralisation der freien Radikale. Vieles deutet aber auch daraufhin, dass das Phänomen durch das gleichzeitige Auftreten verschiedener zellulärer Mechanismen ausgelöst wird. Allerdings ist dabei noch weitgehend ungeklärt, welche weiteren Mechanismen eine Rolle spielen und wie die vorliegenden Veränderungen die kontraktile Funktion der Zelle hemmen. Eine

mögliche Erklärung wäre die Beschädigung des kontraktiven Apparates durch die Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Proteasen<sup>48</sup>.

## **2.5. Reperfusionsschäden**

Klassischerweise unterteilt man die Reperfusionsschäden in „myocardiales stunning“, Reperfusionarrhythmie und letale Reperfusionsschäden<sup>49</sup>. Da das „myocardiale stunning“ schon unter Punkt 2.4. beschrieben wurde und die Reperfusionarrhythmie für das untersuchte Tiermodell keine Bedeutung hat, beschränken sich die weiteren Erläuterungen auf das Phänomen der letalen Reperfusionsschäden.

Hierunter versteht man den durch Reperfusion ausgelösten Zelltod reversibel geschädigter Myozyten, wobei grundsätzlich zwischen der direkt auftretenden Nekrose und der zeitlich verzögerten Apoptose unterschieden wird.

In Bezug auf den nekrotischen Zelltod sind heutzutage drei potentielle Ursachen bekannt: A) Rephosphorylierung von ATP, B) schnelle Normalisierung des intrazellulären pH's und C) schnelle Normalisierung der Gewebeosmolarität<sup>49</sup>. Allerdings sind die genauen Mechanismen, die zur Ruptur der Zellmembran führen noch weitgehend ungeklärt.

Dagegen wurden bisher weder die genauen Ursachen noch die Bedeutung der Apoptose bei der Reperfusion von Herzgewebe erforscht. Folglich muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden, inwieweit diese Kaskade während der Reperfusion ausgelöst wird und welche Bedeutung die Apoptose im Zusammenhang mit den letalen Reperfusionsschäden hat. Inwiefern dieses Phänomen im beschriebenen Modell eine Rolle spielt, wird im Kapitel V diskutiert.

## **3. Apoptose**

### **3.1. Definition und Vorkommen**

Bei der Apoptose handelt es sich um einen von der Zelle selbst ausgelösten aktiven Zelltod. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von programmiertem Zelltod. Dieser physiologisch bedeutsame Prozess ist erstmalig von Flemming im Jahre 1885 an Säugetierfollikeln beobachtet worden<sup>50</sup>. Und obwohl in den darauffolgenden Jahrzehnten noch einige entsprechende Beobachtungen gemacht wurden, konnte Kerr et al.<sup>51</sup> erst 1972 mit seinen Experimenten an Rattenlebern das Verschwinden von Zellen beweisen: einen Vorgang, den er ein Jahr später als Apoptose bezeichnete<sup>52</sup>. Dieses Wort setzt sich aus den griechischen Wörtern apo

(ab, los) und ptosis (Senkung) zusammen, die ein Abfallen von welken Blättern symbolisieren sollen<sup>53</sup>. Physiologisch fungiert die Apoptose als Gegenspieler der Proliferation und spielt vor allem während der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle. Beispielsweise führt die Apoptose zur Einschmelzung der Schwimmhäute zwischen den Fingern des menschlichen Embryos und des Schwanzes der Kaulquappen während der Metamorphose zum Frosch. Aber auch in Bezug auf viele gefürchtete Krankheiten ist die Apoptose von herausragender Bedeutung. Dazu zählen unterschiedliche Leiden wie Karzinom, AIDS oder kardiovaskuläre Erkrankungen.

### 3.2. Ablauf und Morphologie

Heutzutage wird der energiekonsumierende Verlauf der Apoptose in drei Phasen unterteilt<sup>54</sup>. In der Einleitungsphase kann die zelluläre Apoptosemaschinerie durch zwei verschiedene Mechanismen ausgelöst werden. Dabei differenziert man zwischen der Aktivierung durch die in der Zellmembran vorhandenen Todesrezeptoren und der Aktivierung anhand des mitochondrialen Pfades (siehe Kapitel V; Punkt 4.1.). Beide Auslöser führen im Verlauf der folgenden Effektorphase zur vollständigen Aktivierung der sich selbst amplifizierenden Caspasekaskade, die wiederum die Apoptose-spezifischen Endonukleasen in Gang setzt. Erst im dritten als Degradationsphase bezeichneten Abschnitt zeigen sich die typischen Anzeichen der Apoptose. Diese beinhalten die eindeutigen morphologischen Veränderungen und die internukleosomale Fragmentierung der DNA. *In vivo* dauert der komplette Ablauf zwischen 6 und 24 Stunden, wobei die Dauer vom Zelltyp abhängig ist<sup>55</sup>.

Morphologische Kennzeichen der Apoptose sind Zellschrumpfung, Erhöhung der Zytoplasmadichte und Chromatinkondensation<sup>56</sup>. Dabei lagert sich das, aus DNA und gebundenen Proteinen bestehende Chromatin, zu deutlich begrenzten Klümpchen von innen an die intakte Kernmembran. Im weiteren Verlauf löst sich die Zelle aus der Umgebung und der Kern bricht auseinander (Karyorrhexis). Schließlich zerfällt die Zelle in eine Vielzahl kleiner apoptotischer Körperchen (apoptotic bodies). Diese membranumhüllten Strukturen bestehen aus dicht gepackten Zellorganellen und Kernbruchstücken. Besonders auffällig ist dabei, dass die Mitochondrien und die Zellmembran im Gegensatz zur Nekrose kaum Veränderungen zeigen. Da die apoptotischen Zellen meistens einzeln vorliegen und es nicht zu einer Ausschüttung des Lysosomeninhaltes kommt, werden die apoptotischen Körperchen durch die umliegenden Nachbarzellen phagozytiert, ohne dass es zu einer Entzündungsreaktion kommt<sup>57</sup>.

### **3.3. Nachweis der Apoptose**

#### **3.3.1. Nachweis der morphologischen Merkmale**

Mit einem Elektronenmikroskop lassen sich die unter Punkt 3.2. beschriebenen zellulären Veränderungen nachweisen. Aber auch mit Hilfe der Konfokalen Mikroskopie können die Chromatinkondensation und die Kernbruchstücke in Propidium-Iodid- oder Hoechst 33342-gefärbten Präparaten erkannt werden. In beiden Fällen handelt es sich allerdings um rein qualitative Nachweise, die keine Rückschlüsse auf die prozentualen Verhältnisse erlauben.

#### **3.3.2. Nachweis der biochemischen Merkmale**

Ein sehr frühes Ereignis der Apoptose ist die Fragmentierung der DNA durch die endogenen DNA'sen. Bei diesem Prozess entstehen charakteristische Bruchstücke mit 180-200 bp (base pairs)<sup>58</sup>. Diese erhalten durch die Assoziation der core-DNA mit den Histonmolekülen ihre Stabilität. Im Gegensatz dazu erfolgt die DNA-Verdauung bei der Nekrose durch die Aktivierung unspezifischer Proteasen als zufallsbedingte Verdauung (=„random-digest“).

Die bei der Fragmentierung entstehenden Nukleosomen-Monomere und Multimere lassen sich als typische DNA-Leiter auf einem Agarose-Gel darstellen<sup>58</sup>. Dazu muss die DNA aus dem zu untersuchenden Gewebe isoliert und elektrophoretisch aufgetrennt werden. Besteht die untersuchte Probe hauptsächlich aus nekrotischem Material zeigt sich auf dem Gel ein sogenanntes Schmiermuster. Obwohl diese Methode eine eindeutige Abgrenzung zwischen Nekrose und Apoptose ermöglicht, ist sie mit einer Vielzahl von Nachteilen behaftet. Man benötigt relativ viel Material, das Ergebnis ist nicht quantifizierbar und in gemischtem Gewebe ist eine Bestimmung der apoptotischen Zellpopulationen nicht möglich<sup>59</sup>.

Folglich hat sich heutzutage die TUNEL-Technik als Methode der Wahl durchgesetzt. Bei diesem Verfahren werden die Gewebeschnitte entsprechend dem unter Punkt 6 (Kapitel III) beschriebenen Protokoll behandelt. Nach Markierung der 3-OH-Enden der DNA-Fragmente mit Hilfe einer terminalen Deoxynucleotidyl-Transferase werden die apoptotischen Kerne in einem zweiten Schritt mit einem fluoreszierenden Farbstoff sichtbar gemacht<sup>55</sup>. Häufig kombiniert man diese Färbung mit anderen Zell-spezifischen Markern in mehrfach-markierten Schnitten, wodurch eine genaue Zuordnung und Quantifizierung von apoptotischen Zellen im Gewebeverband darstellbar ist.

Neben diesen häufig eingesetzten Methoden gewinnt der Nachweis der Caspasenaktivierung (siehe Punkt 4.1 der Diskussion) immer mehr an Bedeutung.

Beispielsweise lassen sich die Aktivierung von Caspase 3, sowie die Spaltung der Caspasensubstrate Lamin B1 und PARP (Polyadenylribosopolymerase) mittels spezifischer Antikörper histologisch bestimmen<sup>54,60</sup>.

## 4. Nekrose

### 4.1. Definition

Den passiven, energieunabhängigen Zelltod durch externe Faktoren nannte Bessis<sup>61</sup> zufälligen (accidental) Zelltod. Dieser wird durch mechanische oder andere ischämische Schädigungen ausgelöst und endet in der Nekrose (griech. *nekrosis* = Tod, Absterben). Da es sich dabei eigentlich um einen Zustand nach Eintritt des Zelltodes handelt, schlug Majno<sup>62</sup> den Begriff Onkose (griech. onkos = Schwellung) für den mit Schwellung der Zelle einhergehenden Zelltod während der Ischämie vor. Trotz der sinnvollen Namensgebung setzte sich der Begriff nicht durch, weshalb Nekrose in folgenden Abschnitten als Bezeichnung für den ischämischen Zelltod genutzt wird.

### 4.2. Ablauf und Morphologie

Typischerweise wird die Nekrose durch Prozesse während der Ischämie ausgelöst. Abhängig von der Dauer der Ischämie kommt es nach anfänglichen reversiblen Veränderungen zur irreversiblen Schädigung der Zellmembran, die daraufhin den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt der Zelle nicht mehr kontrollieren kann. Dies führt zu einer massiven Schwellung der Zelle und der Zellorganellen mit anschließender Ruptur der Membranen.

Unter dem Lichtmikroskop ist die Nekrose aufgrund der Schwellung eindeutig zu erkennen. Insbesondere die Mitochondrien zeigen eine deutliche Schwellung und eine Fragmentierung der Cristae. Aber auch die Kerne sind irreversibel geschädigt. Das Chromatin ist stark verklumpt und mit fortschreitender Nekrose lösen sich die Kerne auf (Karyolyse). Des Weiteren sind die sogenannten „blebs“ typisch für den ischämischen Zelltod. Hierbei handelt es sich um flüssigkeitsgefüllte Bläschen, die sich von der Zelle ablösen und zerplatzen<sup>62</sup>. Durch die massive Freisetzung von Botenstoffen und das Auftreten im Zellverband ist die Nekrose immer von einer Entzündungsreaktion begleitet, wobei Phagozyten die Reste der nekrotischen Zellen entfernen.

### 4.3. Histologischer Nachweis der Nekrose

Trotz der deutlichen morphologischen Veränderungen im Verlauf der Nekrose, liessen sich die nekrotischen Zellen lange Zeit nur elektronenmikroskopisch oder nach vollständiger Zerstörung mittels H&E-Färbung nachweisen. Allerdings erlaubten beide Methoden keine quantitative Bestimmung der Nekrose. Erst die Einführung von Complement C9-Antikörper als eindeutiger Nekrosemarker bei Ischämie/Reperfusionprozessen veränderte die Situation grundlegend.

Bei dieser Methode werden an MAC (membrane attack complex) gebundene Complement C9 Faktoren mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Voraussetzung für die Bildung dieser Komplexe ist die Aktivierung von Complement C3 über einen alternativen Mechanismus<sup>63</sup>. Dies führt unter anderem zur Bildung des zellmembrangebundenen C5b-8 Moleküls, an das sich wiederum 12-15 Complement C9 Faktoren binden können<sup>64</sup>. Dort lagern sich die einzelnen Komponenten zu transmembranösen, unspezifischen Poren zusammen<sup>65</sup>. Da die membrangebundenen Complement C9 Faktoren nur nekrotische Zellen markieren, hat sich die Methode als zuverlässiger Nachweis durchgesetzt<sup>63,66</sup>.

## 5. Apoptose-relevante Proteine

### 5.1. Bcl-2 Familie

In den letzten Jahren wurden 15 Mitglieder der Bcl-2 Familie identifiziert<sup>67</sup>. Allen ist gemein, dass sie mindestens eine der vier konservierten Bcl-2 homologen Domäne (BH1 bis BH4) besitzen<sup>68</sup>. Hierbei handelt es sich um alpha-Helix Proteinregionen, die eine Homo- oder Heterodimerisation zwischen den einzelnen Mitgliedern ermöglichen. Grundsätzlich ist zwischen anti- und pro-apoptotischen Mitgliedern zu unterscheiden, wobei sich eine Unterteilung in drei Unterfamilien als sinnvoll erwiesen hat<sup>69</sup>. Die erste besteht aus den anti-apoptotischen Mitgliedern, deren Sequenzen in allen vier Regionen (BH1 bis BH4) übereinstimmen (Abb. 1). Zu dieser aus fünf Proteinen bestehenden Gruppe gehört auch das bekannte Bcl-2 und das Bcl-x<sub>L</sub>. Die beiden anderen Unterfamilien beinhalten die pro-apoptotischen Mitglieder. Dabei zeigt die durch Bax, Bak und Bok repräsentierte Unterfamilie Übereinstimmung in den BH1 bis BH3-Domänen (Abb. 1), während die übrigen sieben Mitglieder nur die zentrale kurze BH3-Region haben. Eine weitere Besonderheit der Bcl-2 Familie ist eine hydrophobe C-terminale Transmembrandomäne<sup>70</sup>, die den Proteinen eine Verankerung in den Organellenmembranen ermöglicht.

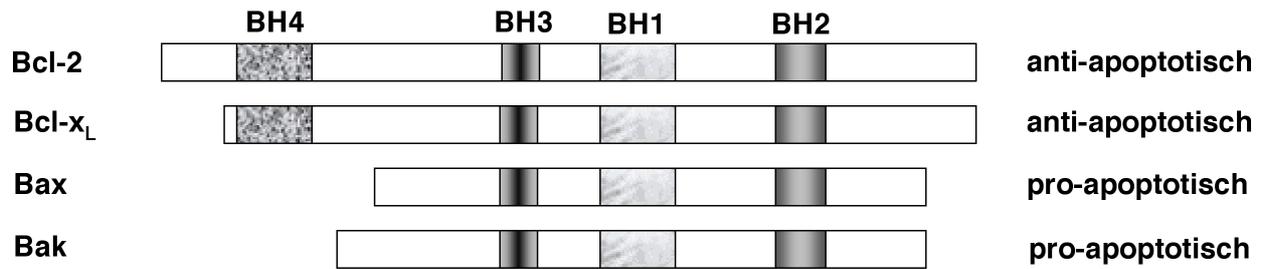


Abb. 1: Schematische Darstellung der wichtigsten Bcl-2-Familien-Mitglieder

### 5.1.1. Bcl-2 Protein

Im Jahr 1985 identifizierten Cleary et al.<sup>71</sup> Bcl-2 als ein an der „B-cell lymphoma 2“ beteiligtes Onkogen, dessen anti-apoptotische Wirkung zwei Jahre später von Vaux et al.<sup>72</sup> demonstriert wurde. Es ist maßgeblich an der äußeren Membran der Mitochondrien lokalisiert, befindet sich aber auch an den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums und des Zellkerns<sup>73</sup>. Dort entfaltet es seine anti-apoptotische Wirkung über verschiedene Mechanismen. Dazu zählen unter anderem die gehemmte Freisetzung pro-apoptotischer Mitochondrienproteine sowie die direkte Hemmung von Bax.

Die Regulierung von Bcl-2 erfolgt hauptsächlich durch Phosphorylierung an verschiedenen Serin-Threonin-Resten. Beispielsweise konnten Ito et al.<sup>74</sup> beweisen, dass die Phosphorylierung an Ser70 für die anti-apoptotische Wirkung erforderlich ist.

Um die Bedeutung von Bcl-2 bei der embryonalen Entwicklung zu untersuchen, entwickelten Veis et al.<sup>75</sup> Bcl-2<sup>-/-</sup> („knock out“) Mäuse. Diese waren bis zur Geburt überlebensfähig, zeigten danach aber eine verzögerte Gewichtszunahme und eine geringere Lebenserwartung. Meistens starben die Tiere an Nierenversagen infolge einer massiven Zystenniere. Weiterhin waren vor allem Thymus und Milz massiv von apoptotischen Prozessen betroffen, und die Tiere wurden innerhalb von 5 bis 6 Wochen grau. Wird dagegen das verwandte Bcl-xl-Gen ausgeknockt, sterben die Embryonen intrauterin durch den massiven Zelltod neuronaler Zellen. Folglich führt der Verlust der protektiven Bcl-2-Proteine automatisch zu einer Zunahme der Apoptose in verschiedenen Zelllinien.

Diese Ergebnisse werden unterstützt durch die nachgewiesene anti-apoptotische Wirkung von überexprimiertem Bcl-2 in Tumoren und transgenen Mäusen<sup>76</sup>.

### 5.1.2. Bax-Protein

Oltvai et al.<sup>75</sup> entdeckten 1993, dass Bcl-2 *in vivo* zu einem geringen Anteil als Heterodimer mit dem Protein Bax (Bcl-2 assoziiertes X-Protein) vorliegt. Dieses

21 kDa Protein besteht aus 192 Aminosäuren und verfügt über die drei BH-Domäne 1 bis 3, sowie über eine hydrophobe C-terminale Transmembranregion. Allerdings konnten Chittenden et al.<sup>77</sup> mittels BH3-entsprechenden Oligopeptiden nachweisen, dass nur die BH3 Region essentiell für die pro-apoptotische Funktion ist.

Unter physiologischen Bedingungen ist der überwiegende Anteil im Zytosol lokalisiert. Erst nach Aktivierung der Apoptosekaskade kommt es zur Dimerbildung und zum Einbau des Bax-Proteins in die Mitochondrienmembran<sup>78</sup>. Hierbei gilt die *in vitro* nachgewiesene Fähigkeit des Bax-Proteins, Poren zu bilden, als mögliche Ursache für die pro-apoptotische Wirkung (siehe Punkt 5.3.2. der Diskussion).

Weitere Erkenntnisse ergaben die Arbeiten von Knudson et al.<sup>79</sup> an Bax knock-out Mäusen. Diese waren zwar lebensfähig, zeigten aber signifikante Veränderungen in Bezug auf den programmierten Zelltod. Hierzu zählte einerseits die zur Infertilität der Männchen führende verringerte Spermatogenese<sup>79</sup>. Andererseits fand sich eine ungewöhnlich hohe Anzahl von Follikeln auf den Ovarien der Weibchen. In diesem Zusammenhang ermittelten Perez et al.<sup>80</sup> eine dreifach erhöhte Rate an Primordialfollikel.

## 5.2. Cytochrom C

Cytochrom C ist ein sehr stabiles, aus 104 Aminosäuren bestehendes, Hämprotein der Atmungskette, das in allen Zellen aerober Organismen vorkommt. Seit vielen Jahren ist die Sequenz, die dreidimensionale Struktur, sowie die Lokalisation an der äußeren Oberfläche der inneren Mitochondrienmembran bekannt. Dort fungiert es als Elektronentransporter zwischen Cytochrom C1 und Cytochromoxidase. Da bei diesem Schritt keine Energie frei wird, beschränkt sich die Funktion des Proteins auf einen reinen Elektronenshuttle zwischen zwei energiegewinnenden Systemen der Atmungskette<sup>81</sup>.

Erst 1996 entdeckten Liu et al.<sup>82</sup> eine weitere wichtige Funktion des Cytochrom C's als Teil des mitochondrialen Pfades der Apoptosekaskade. Das auf nukleären Genen codierte Protein wird in zytosolischen Ribosomen gebildet und als Apocytochrom in das Zytosol abgegeben<sup>83</sup>. Danach erfolgt eine Translokation in die Mitochondrien, wo eine kovalente Bindung mit einer Hämgruppe stattfindet. Nach erneuter Freisetzung des Holocytochroms während der Apoptose bindet das Hämprotein an die C-terminale WD-40-Domäne von Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1). Apaf-1 ist ein aus drei Segmenten bestehendes 130 kDa schweres Protein, das an seinem N-terminalen Ende über eine CARD-Region

verfügt. Diese „caspase-recruiting-domain“ (CARD) findet sich auch in einer Vielzahl von Caspasen und dient unter anderem der Komplexbindung von Apaf-1 und Procaspase 9<sup>81</sup>. In diesem Zusammenhang konnten Li et al.<sup>84</sup> *in vitro* zeigen, dass die in Anwesenheit von dATP stattfindende Bindung des Cytochrom C/Apaf-1-Komplexes mit Procaspase 9 per se zur Aktivierung der Caspase 3 führt (Abb. 2). Dabei ist es möglich, dATP durch viel höhere ATP-Konzentrationen zu ersetzen (1  $\mu$ M dATP im Gegensatz zu 1 mM ATP).

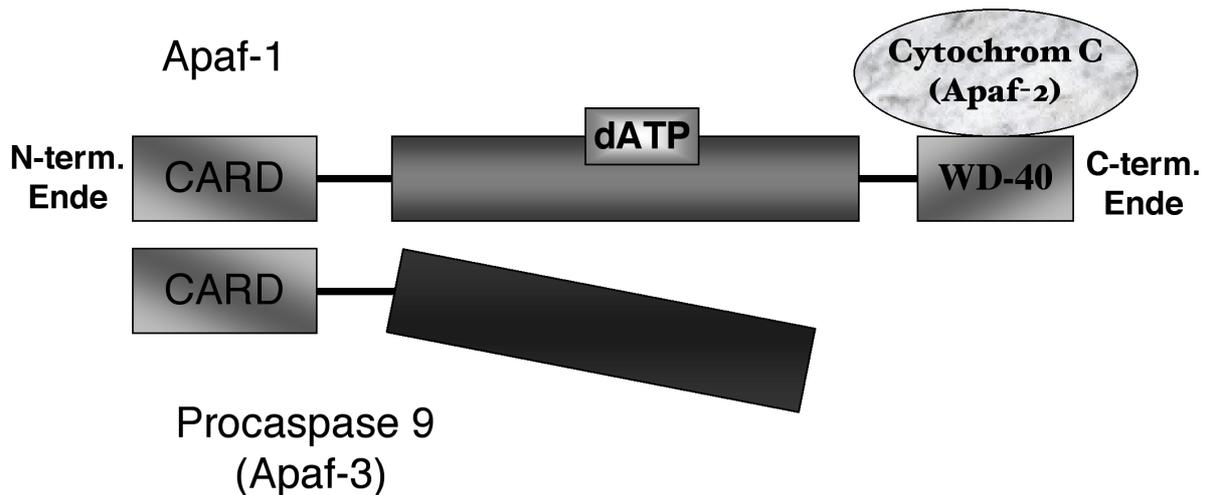


Abb. 2: Zusammensetzung des Apaf-Komplexes bei der Aktivierung von Caspase 9. Apaf = „apoptotic protease activating factor“; CARD = „caspase-recruiting-domain“

Die Beteiligung von Cytochrom C an der Apoptose wurde auch durch die *in vitro* Versuche von Li et al.<sup>85</sup> bestätigt. Ihre aus Cytochrom C knock-out-Embryos gewonnenen Zellen waren gegen Apoptoseinduktoren resistent, die über den mitochondrialen Pfad zum programmierten Zelltod führen. Allerdings starben die Mäuse aufgrund der gestörten Atmungskette schon während der embryonalen Entwicklung.

## 6. Mitochondrien und mitochondriale „permeability transition“

### 6.1. Aufbau und Aufgaben der Mitochondrien

Der Begriff Mitochondrien wurde 1897 von Benda eingeführt und bezeichnet die für die Energiegewinnung verantwortlichen zellulären Organellen. Ihre Anzahl ist sehr stark von der Aktivität der Zelle abhängig, wobei in Hundemyozyten etwa 23% des Zellvolumens aus Mitochondrien besteht.

Der Grundaufbau der Organelle besteht aus einer inneren und einer äußeren Membran, die durch einen 8nm breiten nicht-zytoplasmatischen Raum getrennt sind. Dabei grenzt die glatte äußere Membran (Mitochondrienhülle) das Organell

zum Zytoplasma ab, während die innere Membran eine Vielzahl scheibchenförmiger als Cristae bezeichneten Einstülpungen aufweist. Neben der Vergrößerung der Oberfläche führt diese typische Morphologie zu einer doppelten Kompartimentierung.

Die etwa 7 nm dicke äußere Membran ist durch das kanalbildende Porin für Moleküle bis zu einem Gewicht von 6000 Da permeabel. Dagegen ist der Transport durch die impermeable innere Membran nur mit Hilfe von Translokatoren möglich.

Weitere Besonderheiten sind die elektronendichten Granula und das Vorkommen einer ringförmigen DNA in der inneren Matrix. Diese ermöglicht den Mitochondrien eine eigene Proteinsynthese und charakterisiert sie als semiautonome Organellen. Deren Entstehung wurde 1890 durch die von Altmann aufgestellte Endosymbionten-Hypothese erklärt. Danach waren die Mitochondrien ursprünglich freilebende Organismen, die von den Vorläufern der Eukaryontenzellen aufgenommen wurden. Dementsprechend vermehren sich die Mitochondrien nicht durch *de novo*-Synthese, sondern durch Knospung oder Teilung.

Die Hauptfunktion der Mitochondrien ist die Energiegewinnung aus den vom Organismus aufgenommenen Nährstoffen. Dabei werden die organischen Makromoleküle durch die oxidative Glykolyse unter  $\text{NADH} + \text{H}^+$ -Gewinnung abgebaut. Die an  $\text{NAD}^+$  gebundenen Protonen werden im Verlauf der anschließenden Atmungskette mittels einer Reihe exergonischer Reaktionen an Sauerstoff gebunden, wobei  $\text{H}_2\text{O}$  und ATP als Energiespeicher entstehen.

## **6.2. Aufbau und Regulation der „permeability transition“-Pore (PTP)**

Auch wenn die innere Mitochondrienmembran unter physiologischen Bedingungen impermeabel ist, kommt es unter bestimmten Umständen zu einem Verlust der Permeabilitätsbarriere. Bei diesem, als mitochondriale „permeability transition“ bezeichneten Prozess öffnet sich die „permeability transition“-Pore, gefolgt von einer Diffusion wasserlöslicher Moleküle bis zu einer Molekülmasse von 1500 Da<sup>86</sup>. Die Folge ist ein sofortiger Zusammenbruch des inneren Transmembranpotentials, ein Verlust der mitochondrialen Proteinsynthese sowie eine Entkopplung der Atmungskette<sup>87</sup>. Als essentieller Auslöser gilt eine erhöhte intramitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, wobei die Sensibilität gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst werden kann<sup>88</sup>. Unter anderem führen der Sauerstoffmangel während der Ischämie und ähnliche „Stresssituationen“ zu einer „permeability transition“. Außerdem haben Duchon et al.<sup>89</sup> gezeigt, dass die Öffnung der PTP durch ATP und in geringerem Maße durch ADP verhindert werden kann.

Obwohl der exakte Aufbau der „permeability transition“-Pore noch nicht geklärt ist, weisen die bisherigen Resultate auf eine Beteiligung der folgenden Proteine <sup>68</sup>:

- Porin, auch als „voltage-dependent-anion-channel“ (VDAC) bezeichnet, aus der Gruppe der äußeren Membranproteine
- Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT) aus der Gruppe der inneren Membranproteine
- Cyclophilin D als wasserlösliches Matrixprotein

Folglich befindet sich die „permeability transition“-Pore an den Kontaktstellen der Mitochondrienmembranen, wo sie durch die Zusammenlagerung verschiedener Proteine einen unspezifischen Ionenkanal bildet <sup>90</sup> (Abb. 3).

Inwieweit dieser Mechanismus beim programmierten Zelltod eine Rolle spielt und inwiefern er durch die Proteine der Bcl-2-Familie beeinflusst wird, soll im Kapitel V diskutiert werden.

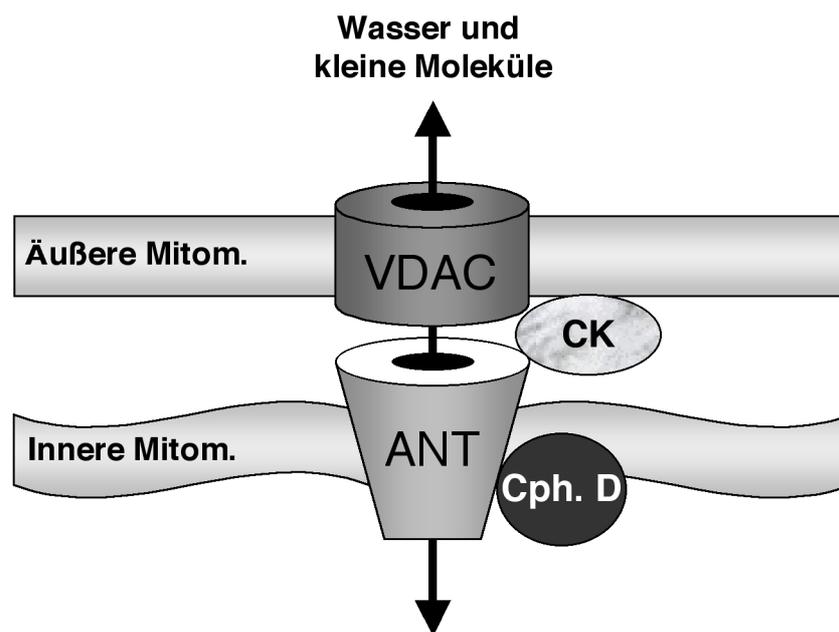


Abb. 3: Schematische Darstellung der „permeability transition“-Pore.

In geöffnetem Zustand können Wasser und kleine Moleküle bis zu einer Größe von 1500 Da die Membranen passieren.

VDAC = „voltage-dependent-anion-channel“, ANT = Adenin-Nukleotid-Translokator; Cph. D= Cyclophilin D; CK= „Creatin-Kinase“; Mitom. = Mitochondrienmembran

## 7. Cyclosporin A

Cyclosporin A, ein lipophiles zyklisches Undekapeptid (Abb. 4), wurde 1969 aus dem imperfekten Pilz *Tolypocladium inflatum gams* isoliert. Neben der Hauptkomponente CsA produziert der Pilz die Cyclosporine B bis I<sup>91</sup>. Allerdings erlangte nur das CsA eine herausragende Bedeutung, nachdem Borel et al.<sup>92</sup> 1976 die starke immunsuppressive Wirkung der Substanz beschrieben hat. Heutzutage wird CsA weitgefächert bei Organtransplantationen eingesetzt, um immunbedingte Abstoßungsreaktionen zu verhindern. In diesem Zusammenhang konnte auch die 5-Jahres-Überlebensrate nach Herztransplantationen von 31% auf 75% gesteigert werden<sup>8</sup>.

In den Zellen bindet CsA mit hoher Affinität an das Cyclophilin A<sup>93</sup>. Hierbei handelt es sich um ein ubiquitär vorkommendes zytoplasmatisches 17 kDa Protein mit einer Peptidyl-Prolin-cis-trans-Isomerase-Aktivität<sup>94</sup>. Im Falle der Immunsuppression führt diese Komplexbindung zu einer Blockade der calciumabhängigen Calcineurin-vermittelten T-Zellen-Aktivierung. Dabei hemmt CsA die Dephosphorylierung der NF-AT's (nuclear factor of activated T-cell) durch Calcineurin in den T-Zellen. Dies verhindert die Translokation des zytoplasmatischen NF-AT-Calcineurin-Komplexes in den Kern. Dort würden die dephosphorylierten NF-AT's durch DNA-Bindung zu einer vermehrten Transkription der Zytokin-Gene und demzufolge zu einer Aktivierung der Immunreaktion führen<sup>95</sup>.

Trotz dieser eindeutig positiven Effekte wird der Einsatz von CsA zur Immunsuppression aufgrund der teilweise schwerwiegenden Nebenwirkungen beschränkt. Besonders wichtig sind dabei die Nieren-, Neuro- und Lebertoxizität sowie das häufige Auftreten der Hyperlipidämie, der Glukose-Intoleranz und der kosmetischen Effekte<sup>96</sup>. Deshalb empfiehlt Magee<sup>96</sup> in einer aktuellen Publikation einen Cocktail aus drei Medikamentenklassen zur Minimierung dieser Nebenwirkungen: A) Calcineurin-Inhibitoren (CsA), B) antiproliferative Substanzen und C) Glukokortikoide.

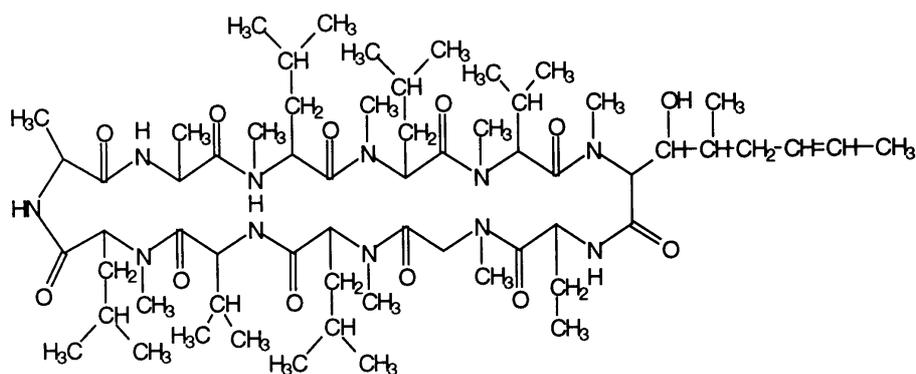


Abb. 4: Strukturformel von Cyclosporin A

## 8. Calcineurin

Calcineurin ist eine ubiquitär in Säugetierzellen vorkommende Serin-Threonin-spezifische  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin abhängige Proteinphosphatase<sup>97</sup>, die ihren Namen durch ihre hohe Affinität gegenüber Calcium und durch das reichhaltige Vorkommen in bovinem Hirngewebe erhielt<sup>98</sup>. Es ist als Heterodimer aus einer katalytischen, Calmodulin-bindende Untereinheit (Calcineurin A) und einer regulierenden, calciumbindenden Untereinheit (Calcineurin B) aufgebaut<sup>99</sup>. Eine weitere Unterteilung des Calcineurin A's (Cn A) in eine alpha, beta und gamma-Isoform wurde von Kuno<sup>100</sup> und Muramatsu<sup>101</sup> beschrieben, wobei nur die alpha-Form in Myozyten vorkommt. Entsprechend unterteilt sich Calcineurin B (Cn B) in Cn B1- (assoziiert mit CnA alpha und beta) und in Cn B2- (assoziiert mit gamma Cn A) Isoform<sup>102</sup>.

Die Aktivierung des synonym als Proteinphosphatase 2B<sup>103</sup> bezeichneten Enzyms erfolgt durch eine Interaktion zwischen den beiden Untereinheiten, Calmodulin und  $\text{Ca}^{2+}$ . Dabei bindet Calmodulin an Calcineurin A, während Calcineurin B vier Bindungsstellen für  $\text{Ca}^{2+}$  hat.

CsA und FK506 hingegen wirken als spezifische Inhibitoren von Calcineurin<sup>104</sup>. Beide Stoffe zeichnen sich durch eine hohe Affinität gegenüber den zytoplasmatischen Immunophilinen aus und blockieren in Verbindung mit Cyclophilin A (CsA) und FKBP12 (FK506) die Enzymaktivität<sup>103</sup>.

Zu den zellulären Prozessen an denen Calcineurin beteiligt ist, gehören neben der unter Punkt 7 detailliert beschriebenen Dephosphorylierung von NF-AT's bei der T-Zell-Aktivierung, die neuronale Entwicklung und die Aktivierung der Proteinphosphatase 1. Weitere Substrate sind Calponin, NOS und Bcl-2<sup>105</sup>.

Dass Calcineurin auch in der Signalkette der Herzhypertrophie eine wichtige Rolle spielt, konnten Molkentin et al.<sup>106</sup> *in vitro* an neonatalen Kardiomyozyten und *in vivo* an transgenen Mäusen zeigen. In beiden Versuchsreihen konnten die Wissenschaftler die Hypertrophie der Herzzellen mit CsA oder FK506 hemmen. Außerdem demonstrierte Molkentin mit Hilfe transgener Mausmodelle die Translokation dephosphorylierter NF-AT 3's in die Zellkerne der Herzmuskelzellen. Dort aktivieren diese den Transkriptionsfaktor GATA 4, der für die Hochregulierung der Hypertrophiegene verantwortlich ist<sup>106</sup>.

Trotz der bemerkenswerten Resultate entbrannte eine Kontroverse bezüglich der Interpretation dieser Ergebnisse. Denn sowohl Zang et al.<sup>107</sup> als auch Ding et al.<sup>108</sup> konnten zeigen, dass die Herzhypertrophie in Mäusen und Ratten aufgrund experimentell erhöhter Nachlast unabhängig von CsA ist. Zur eindeutigen Klärung

dieser Frage müssen in Zukunft weitere Untersuchungen zu diesem Thema durchgeführt werden.

## **III. MATERIAL UND METHODEN**

### **1. Tiermodell**

In dieser Studie wurde ein *in vivo* Modell der globalen Langzeit-Ischämie bei heterotop angeschlossenen Hundeherzen eingesetzt.

Bei diesem Modell werden die Herzen von anästhesierten Hunden nach Thorakotomie entnommen und 18 Stunden in kardioprotektiver Lösung (mit und ohne Zusatz von Cyclosporin A) gelagert. Danach werden sie an ein Empfängertier angeschlossen und sechs Stunden reperfundiert.

#### **1.1. Material**

##### **1.1.1. Versuchstiere**

Als Versuchstiere wurden 24 „Hound-Dogs“ im Alter zwischen zwei und drei Jahren verwendet. Diese zwischen 25 und 30 Kilogramm schweren Tiere entstammen einer speziellen Zuchteinrichtung für Versuchstiere in North Carolina, USA. In dieser Einrichtung werden die Tiere in Gruppen gehalten und einer regelmäßigen Gesundheitskontrolle unterzogen, wobei die Freiheit von den wichtigsten hundespezifischen Infektionserregern, sowie des Herzwurms, kontrolliert wird.

Alle Hunde wurden einige Wochen vor den eigentlichen Versuchen in der Tierversuchsanlage des Heinemann Medical Research Centers in Charlotte, North Carolina, USA eingestellt und in den Versuchsräumen der Einrichtung operiert. Tierschutzrechtlich wurden die Hunde entsprechend der aktuellen amerikanischen Richtlinien des „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ gehalten und behandelt.

#### **1.2. Methode**

##### **1.2.1. Prämedikation und Narkose**

Die Hunde wurden mittels einer intra-venösen Bolusgabe mit Pentobarbital (30 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert und während der gesamten Operation über einen Oro-Trachealtubus mit Raumluft beatmet (Havardpumpe). Zur Kontrolle der Narkosetiefe wurden die Reflexe im Verlauf der Operation regelmäßig getestet, und bei Bedarf wurde Pentobarbital über einen Venenverweilkatheter nachdosierte.

## 1.2.2. Operationstechnik

### 1.2.2.1. Entnahme des Herzens

Nach erfolgreicher Narkose und Intubation wurde das Spendertier in Rückenlage fixiert und der Brustbereich großflächig rasiert. Zur kontinuierlichen Gabe von physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) wurde ein Venenverweilkatheter in die Vena (V.) saphena gelegt. Dieser Katheter diente auch der Applikation von 10 mg CsA /kg Körpergewicht in der, aus sechs Tieren bestehenden, Versuchsgruppe. Sechs weitere Hunde dienten als Kontrollgruppe und wurden ausschließlich mit 0,9%igem NaCl infundiert.

Im weiteren Verlauf wurden die Haut und die Pektoralismuskulatur, sowohl links- als auch rechtsseitig, halbkreisförmig mit einem Kauter (Valleylab Force 1C Electrosurgical Generator) durchkautert. Anschließend wurde die Brusthöhle im rechten und linken 4. Intercostalraum unter langsamem Vortasten mit einer Schere eröffnet, und die Arteria (A.) interna thoracica dexter und sinister, sowie die entsprechenden Venen, freigelegt. Nach Ligierung der Gefäße wurde das Sternum durchtrennt und die Enden gespreizt. Die durch den gesamten Thorax ziehenden Nervi phrenici mussten vor und hinter dem Herzen ligiert und abgeschnitten werden, um Rhythmusstörungen während der Herzentnahme zu verhindern.

Außerdem wurden nach Entfernen des Thymus folgende Gefäße freigelegt und die Ligaturen vorbereitet:

A. subclavia sinister, A. subclavia dexter, A. carotis communis dexter et sinister, Aorta und Vena cava cranialis et caudalis.

Im Anschluß wurde der Herzbeutel mit einer Metzenbaum-Schere eröffnet. Die im Herzbeutel vorliegenden A. (1) und V. (3 linke und 3 rechte) pulmonalis wurden sorgfältig dargestellt und zur Ligatur vorbereitet.

Nach der Gabe von Heparin (300 I.U./kg KW) durch den Venenverweilkatheter wurde die Zuleitung für die kardioplegische Lösung in die A. carotis communis sinister gelegt, und eine als Abfluss für das Blut dienende Plastikhülse in die A. pulmonalis eingebracht. Gleichzeitig wurden die Ligaturen von Aorta und Vena cava cranialis et caudalis festgezogen, und die Kontrollbiopsien wurden entsprechend der unter Punkt 1.2.2.5. beschriebenen Verfahren entnommen. Anschließend erfolgte unter Druck die Zufuhr von eiskalter Kardioplegia, um die kontraktile Herzaktivität schlagartig zum Erliegen zu bringen. Danach wurden die restlichen Ligaturen festgezogen, die Gefäße durchtrennt und das Herz entnommen.

### 1.2.2.2. Aufbewahrung des Herzens

Das Herz wurde nach der Entnahme 18 Stunden in „University of Wisconsin“(UW)-Lösung in einer RM6 (Lauda Brinkmann) aufbewahrt. Hierzu wurde die sich im Herzen befindliche Kardioplegia über den Zugang in der A. carotis communis sinister durch UW-Lösung ersetzt. Während der 18-stündigen globalen Ischämie wurde das in einem Plastikbeutel verpackte Spenderherz bei 4 bis 6°C kontinuierlich mit 90 ml UW-Lösung pro Stunde perfundiert.

Bei den Herzen der CsA-behandelten Versuchsgruppe wurde die eingesetzte „University of Wisconsin“(UW)-Lösung mit  $10^{-5}$  mol/l CsA versetzt.

### 1.2.2.3. Reperfusion des Herzens

#### *Vorbereiten des Empfängertieres und des Spenderherzens*

Entsprechend der Entnahme wurde das Empfängertier narkotisiert, intubiert und in Rückenlage auf einer Wärmedecke (37°C) fixiert. Die Halsgegend und die Inguinalgegend wurden rasiert. Anschließend wurde die Haut des linken Innenschenkels auf einer Länge von 15 cm mit einem Kauter durchtrennt und die darunterliegende A. femoralis freipräpariert. Entsprechend wurde auf der rechten Seite die V. femoralis dargestellt.

Zur Darstellung der Halsgefäße wurde medial am Hals ein 20 cm langer Hautschnitt durchgeführt und die Vena jugularis der rechten Seite freipräpariert. Danach wurde der Musculus longus colli mit einem Kauter durchtrennt und die dadurch freigelegte A. carotis communis sinister vom anliegenden Nerv getrennt. Als letzter Schritt der Vorbereitung wurden 300 I.U. Heparin/kg KW appliziert.

Gegen Ende der Vorbereitungen wurde das Spenderherz aus der Maschine genommen und entsprechend der unter Punkt 1.2.2.5. beschriebenen Gewebeprobeentnahmen behandelt.

#### *Anschluss und Reperfusion des Spenderherzens*

Das Spenderherz wurde auf ein Heizkissen seitlich vom Kopf des Empfängers gelegt und über ein Plastikröhrenlabyrinth an die freigelegten Halsgefäße angeschlossen (Abb. 5). Hierbei wurde die A. carotis communis sinister (a) über eine Schlauchverbindung mit der A. brachio-cephalica (f) des Spenderherzens und die Vena jugularis (c) mit der A. pulmonalis (d) des Spenderherzens verbunden. Zwischen beiden Schläuchen befand sich eine Querverbindung (b), die nur während der stündlichen Funktionsmessungen geöffnet wurde.

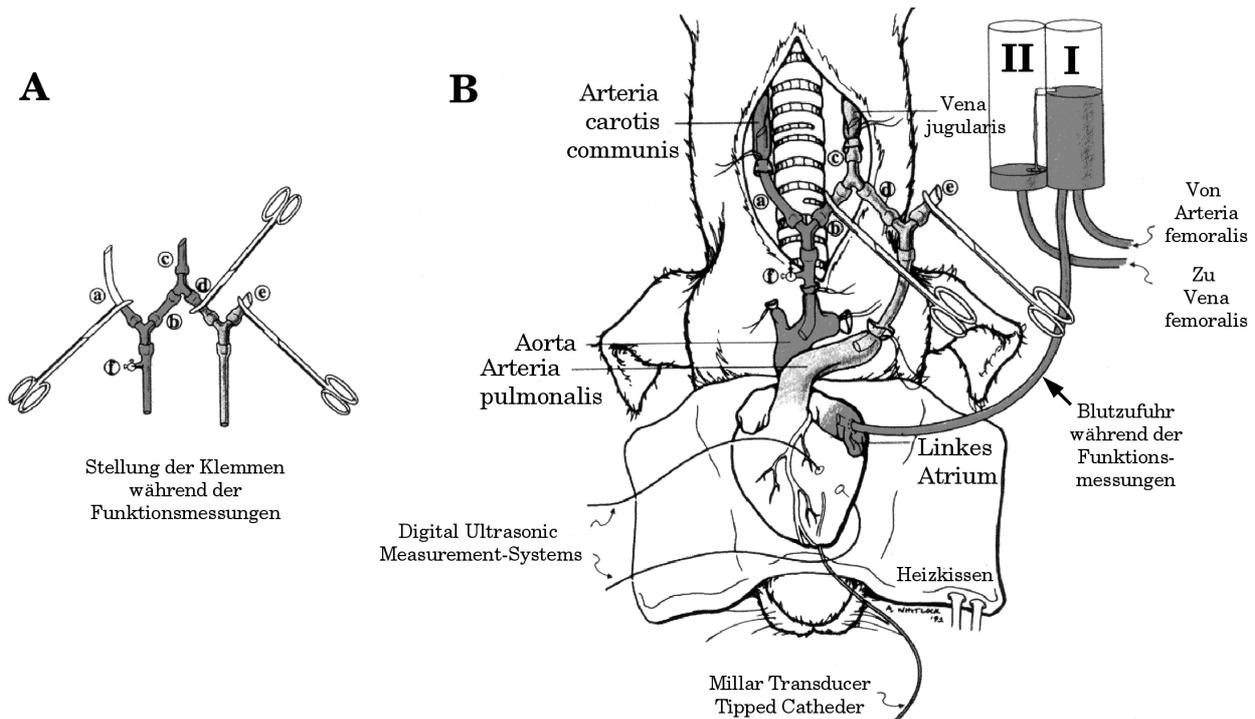


Abb. 5: Schematische Darstellung des Tiermodells:

Die Abbildung **B** zeigt die normale Reperfusion des Spenderherzens nach Anschluss an das Empfängertier. Durch den Verschluss der Querverbindung *b* wurde der Blutfluss von der A. carotis über die Koronargefäße in die Vena jugularis geleitet. Während der Funktionsmessungen wurden die Schlauchverbindungen *a* und *d* entsprechend der linken Darstellung (**A**) verschlossen. Dadurch floss das Blut aus dem Zylinder I über den linken Vorhof in die linke Herzkammer und von dort in die Vena jugularis.

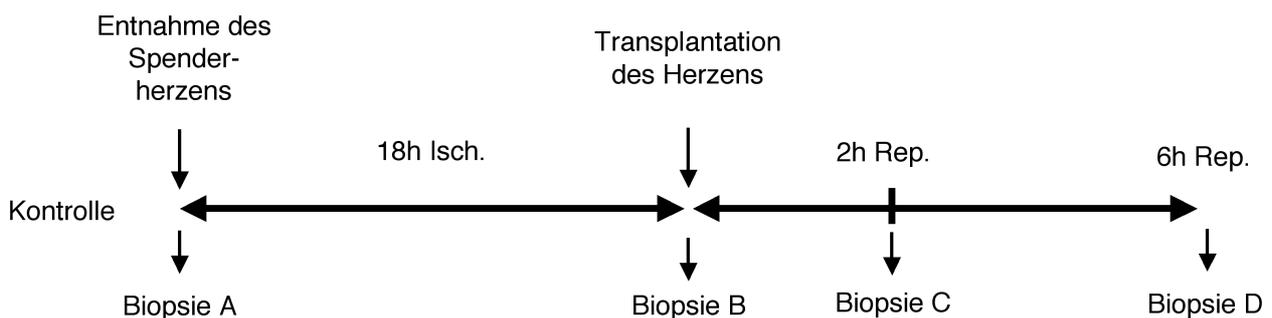
Gleichzeitig wurden die freigelegte A. und V. femoralis ligiert und über Plastikschläuche an einen Plexiglas-Doppelzylinder angeschlossen. Zwischen den beiden Zylindern befand sich ein Überlauf, der eine maximale Füllung von 150 ml Blut im Zylinder I erlaubte. Durch die Verbindung der A. femoralis mit dem Zylinder I wurde dieser gefüllt, wobei das Blut bei einer Füllung von 150 ml über einen Überlauf in den Zylinder II und von dort aus in die Vena femoralis des Empfängertieres floss. Ein zweiter, nur während der Funktionsmessungen genutzter, Schlauch führte vom Zylinder I zum linken Herzohr und dort in den linken Vorhof. Durch die definierte Füllmenge und die Positionierung des Zylinders in einer bestimmten Höhe wurde bei der Funktionsmessung eine konstante Ausgangsvorlast von 15 mm Hg erreicht (Abb. 5).

Nach vollständigem Anschluss des Spenderherzens wurde das Herz reperfundiert. Hierzu wurde die sich im Herzen befindende UW-Lösung langsam durch Blut aus der A. carotis communis sinister (*a*) ersetzt und nachfolgend die Herztätigkeit durch Defibrillation (Physio-Control Lifepak 9 Cariat Monitor Defibrillator) wiederhergestellt. Während der Reperfusion floss das Blut aus der A. carotis

communis sinister (a) des Empfängers in die Aorta (f) und weiter in die linke Herzkammer des Spenderherzens. Das Blut erreicht weiterhin über die von der Aorta abzweigenden Koronargefäße die rechte Herzkammer. Von dort wurde das Blut durch die Kontraktionen des Herzens gegen die konstante Nachlast über die A. pulmonalis (d) in die Vena jugularis (c) des Empfängers gepumpt (Abb. 5).

Nach Stabilisierung der Herztätigkeit wurden die zur Funktionsbestimmung notwendigen Kristalle und Drucksonden angebracht. Dazu wurden die Kristalle des „Digital Ultrasonic Measurement-Systems“ (Sono Metrios Corporation) zur Durchmessermessung gegenüber voneinander in die linke Herzkammer plziert. Zuletzt wurde der „Millar Transducer Tipped Catheter“ in die Spitze des linken Ventrikels zur intra-ventrikulären Druckmessung eingeführt. Im Verlauf der Reperfusion wurden stündlich Funktionsmessungen durchgeführt, sowie zwei Gewebeproben entnommen (siehe Schema 1.2.2.4.). Zum Ende des Versuchs wurden die Empfängertiere mit einer KCl-Injektion euthanasiert.

#### 1.2.2.4. Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls



#### 1.2.2.5. Probenentnahme

Während des Versuchs wurden zu vier verschiedenen Zeitpunkten Gewebeproben mit einem elektrischen Drillbohrer (DeWalt DW952) entnommen (siehe Schema 1.2.2.4.):

- |   |                        |                                     |
|---|------------------------|-------------------------------------|
| A | Kontroll-Biopsie       | Entnahme vor der Ischämie           |
| B | Ischämie-Biopsie       | Entnahme nach 18stündiger Ischämie  |
| C | 1. Reperfusion-Biopsie | Entnahme nach 2 Stunden Reperfusion |
| D | 2. Reperfusion-Biopsie | Entnahme nach 6 Stunden Reperfusion |

Für die Immunhistochemie wurden die Myokardbiopsien mit Hilfe einer, in die Bohrmaschine eingespannten, Kupferhülse aus dem apikalen Teil des linken Ventrikels gewonnen. Diese zylinderförmigen Gewebeproben wurden direkt nach

der Gewinnung in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren und in beschriftete Plastikröhrchen verpackt.

Jeweils zum gleichen Zeitpunkt wurden die wesentlich kleineren Biopsien für die Elektronenmikroskopie mit einem eingespannten Glasröhrchen entnommen. Diese wurden im Anschluss mit einem Skalpell zerkleinert und in beschrifteten Glasgefäßen mit einem Gemisch aus 3%igem Glutaraldehyd und 0,1 M Cacodylatpuffer (pH-Wert von 7,4 und Osmolarität von 400 mosm) fixiert.

Die für die ATP-Bestimmung notwendigen Proben wurden stündlich während der Reperfusion mit einer, in flüssigem Stickstoff gekühlten, Glaspipette gewonnen und direkt für die HPLC-Analyse vorbereitet. Als Kontrolle diente eine jeweils vor der Ischämie entnommene Probe.

Zur weiteren Untersuchung wurden die Biopsien für die Immunhistochemie und die Elektronenmikroskopie per Luftpost an das Max-Planck-Institut nach Bad Nauheim geschickt. Hierbei wurden die schockgefrorenen Myokardproben in Trockeneis versandt und direkt nach der Ankunft bei -80°C gelagert, während die in Glutaraldehyd fixierten Proben nach dem Transport bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt wurden.

## **2. ATP-Analyse**

Die Bestimmung des ATP-Gehaltes des Gewebes wurde im Heinemann Medical Research Center in Charlotte, North Carolina mittels Hoch-Druck-Flüssigkeits-Chromatographie (engl. HPLC) durchgeführt. Dazu wurden die, mittels einer gekühlten Glaspipette gewonnen, Proben (siehe Punkt 1.2.2.5.) direkt nach der Entnahme in Extraktionslösung homogenisiert und nach der Methode von Jennings et al.<sup>109</sup> für die Analyse vorbereitet. Nach Fällung der, im Homogenat vorliegenden, Proteine, wurde der Überstand gewonnenen, neutralisiert und auf den Gehalt an ATP untersucht. Die Bestimmung des ATP-Gehaltes erfolgte mit der, nach Anderson und Murphy<sup>110</sup>, modifizierten, Umkehrchromatographie in einem Supelco Supercosil LC-18-T (250x4,6 mm; 5 µm Säule).

## **3. Funktionsmessungen**

Die Funktionsmessungen bei dynamisch abnehmender Vorlast wurden während der Reperfusionsphase stündlich durchgeführt. Hierbei wurde die endsystolische Elastizität (ESE) auf der Basis der gemessenen linksventrikulären Druck- und Durchmesserwerte berechnet.

### 3.1. Material

Digital Ultrasonic Measurement System  
Millar Transducer Tipped Catheter

Sono Metrios Corporation  
Millar Instruments

### 3.2. Methode

Für die Funktionsmessungen wurden die, zur Durchmessermessung notwendigen Kristalle sowie der intraventrikuläre Druckmesser -wie unter Punkt 1.2.2.3. beschrieben- in die linke Herzkammer eingeführt. Kurz vor den Messungen wurde die Querverbindung (b) des Plastiklabyrinths und die Zufuhr des Blutes aus dem Zylinder I geöffnet (Abb. 5). Gleichzeitig wurden die Zufuhr aus der A. femoralis und die Verbindungen (a) und (d) mittels Klemmen verschlossen (Abb. 5). Hierdurch floss das Blut während der Messung aus dem Zylinder I in die linke Vorkammer und wurde von dort, durch die Kontraktion des Myokards, in den linken Ventrikel und anschließend durch die Aorta des Spendertieres in die Vena jugularis des Empfängertieres gepumpt. Dabei nahm die Vorlast entsprechend der Abnahme des Blutpegels in Zylinder I dynamisch ab, während die, durch die Vena jugularis vorgegebene Nachlast konstant blieb. Die kontinuierlich aufgezeichneten Messparameter wurden im Computer (Princeton E070) gespeichert und graphisch ausgewertet. Hierbei wurden die Durchmesserwerte auf der x-Achse und die Druckwerte auf der y-Achse aufgetragen. Durch den Wechsel von Systole (hoher Druck und geringer Durchmesser) und Diastole (geringer Druck und großer Durchmesser) stellten sich die Kontraktionen graphisch als immer größer werdende Schleifen dar, deren Maxima im Normalfall auf einer Gerade liegen. Als Maß für die Funktionalität wurde die, als endsystolische Elastizität (ESE) bezeichnete, Steigung der Geraden berechnet.

## 4. Elektronenmikroskopie

Für eine genaue Beurteilung der ischämischen Schädigung wurde das Gewebe mit Hilfe eines Transmissions-Elektronenmikroskops untersucht. Bei diesen Mikroskopen werden die, von einer Kathode emittierten Elektronen in einem elektrischen Feld beschleunigt. Nach dem Durchtritt durch eine winzige Öffnung bilden diese Elektronen einen sogenannten Elektronenstrahl, der mittels verschieden angeordneter Magnetspulen fokussiert und auf das kontrastierte Präparat geleitet wird. Dort wird ein, von der Dichte des Materials abhängiger, Teil der Elektronen gestreut, während die übrigen für die Bildentstehung auf einem fluoreszierenden Schirm gebündelt werden (Alberts, Molekularbiologie der Zelle).

## **4.1. Material**

### **4.1.1. Gewebe**

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden an den, in Glutaraldehyd fixierten, Biopsien (siehe Punkt 1.2.2.5.) durchgeführt.

### **4.1.2. Verbrauchsmaterialien**

Waschpuffer:        0,1 M Cacodylat  
                          7,5% Saccharose  
                          auf 1 Liter Aqua dest. auffüllen

Epon (für 48 ml): 22 ml LX-120 (Resin)  
                          17 ml DDSA (Dodeceny-Succinic-Anhydrade)  
                          8 ml NMA (Nadic-Methyl-Anhydrade)  
                          1 ml DMP-30 (Katalysator)

### **4.1.3. Geräte**

Einbettungsautomat: Lynx Microscopy Tissue Processor (Leica)  
Ultramicrotom:        Ultracut-E (Reichert-Jung)  
Elektronenmikroskop: EM 210 (Philips)

## **4.2. Methode**

### **4.2.1. Probenvorbereitung**

Bevor die eigentliche Einbettung durchgeführt werden konnte, wurden die Gewebestücke in kleine Siebe gepackt und in drei zweistündigen Waschsritten mit Cacodylatpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Proben über Nacht im Einbettungsautomaten weiterverarbeitet (Tab. 1).

Nach Beendigung der Einbettungsprozedur wurden die Biopsien in einer Ausgießform (Plano) ausgerichtet, mit Epon überschichtet und zwei Tage im Wärmeschrank bei 50°C auspolymerisiert.

Tab. 1: Arbeitsschritte im Einbettungsautomaten

	Medium	Temp.	Dauer
1	Osmium *	20°C	120 Minuten
2	Cacodylatpuffer	20°C	3 x 15 Minuten
3	Alkohol ** 30%	20°C	15 Minuten
4	Alkohol 50%	20°C	30 Minuten
5	Alkohol 70%	20°C	30 Minuten
6	Alkohol 90%	20°C	30 Minuten
7	Alkohol 100%	20°C	2 x 30 Minuten
8	Propylenoxid	20°C	2 x 15 Minuten
9	Propylenoxid/Epon <sup>♣</sup>	20°C	60 Minuten
10	Epon	37°C	2 x 60 Minuten
11	Epon	56°C	15 Minuten

\* Die Nachfixierung mit Osmiumtetroxid führt zu einer Stabilisierung der Lipide.

\*\* Durch den Alkohol wird das Gewebe entwässert.

♣ Epon = Kunstharz

#### 4.2.2. Elektronenmikroskopische Auswertung

Für die elektronenmikroskopische Auswertung mussten 50nm dicke Schnitte hergestellt werden. Dazu wurden die Eponblöcke mit einer Rasierklinge getrimmt und mit einem, in das Ultramikrotom eingespannten, Diamantmesser geschnitten. Die Schnitte wurden mit einem Kupfergrid aufgefangen und nach der Methode von Reynolds kontrastiert. Diese, mit 3%igem Uranylacetat und Bleizitrat durchgeführte, Kontrastierung führt über eine Komplexbindung von biologischen Molekülen mit den Salzen der Schwermetalle zu einer Darstellung der Zellstrukturen. Danach wurden die Präparate über eine Schleuse in das Hochvakuum des Elektronenmikroskops geführt und entsprechend der Kriterien von Schaper et al. <sup>10,38</sup> in folgende Gruppen eingeteilt:

1. Normales Myokard
2. Leicht reversibel geschädigtes Myokard
3. Schwer reversibel geschädigtes Myokard
4. Irreversibel geschädigtes Myokard

Zu Dokumentationszwecken wurden Schwarz-Weiß-Aufnahmen der markanten Ausschnitte mit Scientia EM Filmen (Agfa Gevaert GmbH) angefertigt.

## 5. Immunhistochemie

### 5.1. Material

#### 5.1.1. Gewebe

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden die tiefgefrorenen Myokardbiopsien (siehe Punkt 1.2.2.5.) verwendet.

#### 5.1.2. Antikörper

##### 5.1.2.1. Primäre Antikörper

Zur Detektion von spezifischen Proteinen wurden bei den Versuchsreihen verschiedene monoklonale (Wirt: Maus) und polyklonale (Wirt: Kaninchen (Kan.) oder Ziege) Antikörper eingesetzt.

Tab. 2: 1. Antikörper

Antikörper	Klon	Wirt	Verd.	Fixierung	Hersteller
Alpha-Aktinin	EA-53	Maus	1 :100	*PFA	Sigma
Lamin B1	101-B7	Maus	1 :20	*PFA	Calbiochem
Lamin A	(N-18)	Ziege	1 :20	Azeton	Santa Cruz
Complement C9	NS1-Ag4-1	Maus	1 :50	*PFA	Novocastra Ltd
Complement C9		Kan.	1 :50	*PFA	Serotec

\*PFA = Paraformaldehyd

##### 5.1.2.2. Sekundäre Antikörper

Die Biotin-konjugierten Sekundärantikörper dieser Studie richteten sich nach dem Wirt der zuvor benutzten Primärantikörper.

Tab. 3: 2. Antikörper

Antikörper	Wirt	Verd.	Hersteller
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG	Esel	1:100	Jackson Immuno-Research
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG	Esel	1:100	Jackson Immuno-Research
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG	Esel	1:100	Jackson Immuno-Research

### 5.1.2.3. Detektionssystem

Bei allen Färbungen handelt es sich um sogenannte indirekte Markierungen, d.h. die Fluoreszenz-Farbstoffe sind nicht direkt an die Sekundärantikörper gekoppelt. Daher wurde folgendes Detektionssystem zur Darstellung der gebundenen Sekundärantikörper verwendet:

Tab. 4: Streptavidin

Bezeichnung	Verd.	Hersteller
Cy2-conjugated Streptavidin	1:100	Rockland

Cy2 ist ein sehr stabiles grünfluoreszierendes Carbocyanin, das sich mit Hilfe des konjugierten Streptavidins an das Vitamin Biotin bindet. Durch den Einsatz der Streptavidin-Biotin-Methode kommt es zur Intensivierung der Fluoreszenz, da Biotin über vier Bindungsstellen für Streptavidin verfügt.

### 5.1.3. Phalloidin

Das, als hochgiftiges Pilztoxin des Fliegenpilzes (*Amanita phalloides*) bekannte Phalloidin wurde zur Markierung des F-Aktins (filament-Aktin) der Herzmuskelzellen eingesetzt. Hierzu wurde das rot-fluoreszierende TRITC-gekoppelte Phalloidin 1:1000 verdünnt und entsprechend dem Färbeprotokoll (siehe Punkt 5.2.3.) aufgetragen.

### 5.1.4. Kernfarbstoffe

Die Zellkerne wurden mit verschiedenen Kernfarbstoffen dargestellt.

Tab. 5: Kernfarbstoffe

Bezeichnung	Verd.	Hersteller	Farbe / Wellenl.
Propidium-Iodid	1:1000	Fa. Molecular Probes	Rot / 617 nm
Toto 3	1:1000	Fa. Molecular Probes	Dunkelrot / 660 nm
DAPI *	1:100	Fa. Molecular Probes	Blau / 461 nm

*\*DAPI= 6,6-diamidino-2-phenylindole-dilactate*

Bei den beschriebenen Kernfarbstoffen handelt es sich ausschließlich um Fluoreszenz-Farbstoffe, die sich spezifisch an die DNA der Zellkerne binden. Dabei wurden die mit Lamin B1/A-Antikörpern markierten, sowie die entsprechend der TUNEL-Methode behandelten Schnitte mit dem besonders stabilen DAPI gefärbt. Dieser Farbstoff eignet sich besonders gut für die Quantifizierung bei

Dreifachmarkierungen, da die blaue Fluoreszenz einen deutlichen Kontrast zu den verwendeten grünen und roten Markierungen zeigt. Um mit Hilfe des Konfokalen Mikroskops Bilder zu erstellen, wurden Propidium-Iodid (bei Doppelmarkierungen) und Toto 3 (bei Dreifachmarkierungen) eingesetzt. Diese Farbstoffe bleichen zwar schneller aus, lassen sich aber, im Gegensatz zu DAPI, mit unserem Konfokalen Lasermikroskop darstellen.

#### **5.1.5. Verbrauchsmaterialien**

##### PBS (Phosphate Buffered Saline)

Bei der Herstellung der Stammlösung wurden 397,4 g NaCl, 10 g KCl, 10 g  $\text{H}_2\text{PO}_4$  und 88,75 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  in 5 Liter Aqua dest. aufgelöst.

Für das gebrauchsfertige PBS wurden 500 ml dieser Lösung mit Aqua dest. auf 5 Liter verdünnt und auf einen pH von 7,4 eingestellt.

##### Mowiol

Da Mowiol (Hoechst) sehr schwer löslich ist, muss es sechzehn Stunden in PBS gerührt werden. Anschließend wurde der Überstand bei 12000 UPM abzentrifugiert und bei 6°C im Kühlschrank gelagert.

##### 4% Paraformaldehyd (PFA)

Hierbei wurden 40 g Paraformaldehyd (Merck) und drei Natriumhydroxid-Plätzchen (Merck) in einem Liter PBS unter kontinuierlichem Rühren aufgelöst. Danach wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und das aliquotierte PFA bei -20°C aufbewahrt.

#### **5.1.6. Mikroskope**

Die Quantifizierung der Lamin B1- sowie der Lamin A-Färbung wurde an einem DM-RB Fluoreszenz-Mikroskop der Firma Leica durchgeführt.

Von den gefärbten Gewebeschnitten wurden mit Hilfe des Konfokalen Lasermikroskops (Leica) Bilder gemacht, die mit den Programmen Imaris und Selima (Bitplane) an einer Octane-Workstation aufgearbeitet wurden.

## **5.2. Methoden**

### **5.2.1. Herstellung der beschichteten Objektträger**

Für die durchgeführten Versuche wurden ausschließlich beschichtete Objektträger verwendet, da die Silikonbeschichtung ein Ablösen der Schnitte während der häufigen Inkubations- und Waschschrte verhindert. Hierzu wurden die unbeschichteten Objektträger mit, in Wasser gelöstem, Extran (Merck) gereinigt, mit Aqua dest. gespült und über Nacht im Trockenschrank (40°C) getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Objektträger für 5 Sekunden in einer 2%igen 3-Aminopropyltriethoxysilane-Lösung (Sigma) getaucht und nach kurzem Spülen in Aceton und Aqua dest. wieder über Nacht getrocknet.

### **5.2.2. Herstellung der Gefrierschnitte**

Die, für die verschiedenen Färbungen notwendigen, 5  $\mu\text{m}$  dicken Gefrierschnitte wurden mit einem CM 3000 Kryostaten der Firma Leica hergestellt. Zu diesem Zweck wurden die, bei -80°C gelagerten, Myokardbiopsien mit Tissue-Tek (O.T.C. Compound 4583, Fa. Miles) auf die vorher beschrifteten Probenhalter aufgeblickt. Hierbei wurde die Biopsie im Innenraum des Kryostaten (-26°C) mit Tissue Tek auf die Probenhalter vorfixiert und anschließend komplett von Tissue Tek umhüllt in flüssigen Stickstoff getaucht. Das rasche Auspolymerisieren des Tissue Teks bei tiefen Temperaturen führt zu einer stabilen Fixierung des Gewebes und bietet gleichzeitig einen Schutzmantel beim Schneiden der Proben. Nach dem Anscheiden der Proben wurden die unter dem Deckgläschen aufgefangenen Schnitte vorsichtig mit einem, bei Zimmertemperatur gelagerten, Objektträger aufgefangen und bis zur Fixierung im Innenraum des Kryostaten aufbewahrt. Das nicht verwendete Gewebe wurde aufgeblickt bei -80°C gelagert.

### 5.2.3. Färbeprotokoll

Tab. 6: Arbeitsprotokoll für die Immunohistochemie

	Arbeitsschritt	Reagenz	Temp.	Zeit
1a	Fixierung	PFA	RT	10 Min.
1b	Fixierung	Aceton	-20°C	10 Min.
2	Waschen	PBS	RT	3 x 5 Min.
3	1. Inkubation	1. Antikörper	4°C	16 Stunden
4	Waschen	PBS	RT	3 x 5 Min.
5	2. Inkubation	2. Antikörper	RT	2 Stunden
6	Waschen	PBS	RT	3 x 5 Min.
7	3. Inkubation	Cy2-Streptavidin	RT	1,5 Stunden
8	Waschen	PBS	RT	3 x 5 Min.
9	4. Inkubation	Phalloidin	RT	20 Min.
10	Waschen	PBS	RT	3 x 5 Min.
11	5. Inkubation	Kernfarbstoffe	RT	20 Min.
12	Waschen	PBS	RT	3 x 3 Min.
13	Eindecken	Mowiol	RT	

*RT= Raumtemperatur*

#### Fixierung

Die Fixierung führt durch Quervernetzung zu einer Stabilisierung der Gewebestrukturen. Dabei ist die Wahl des Fixierungsreagenz abhängig vom Primärantikörper (Tab. 2). Ist eine Fixierung mit Aceton für die optimale Wirkung des Primärantikörpers notwendig, müssen die Objektträger vor dem Waschen luftgetrocknet werden, um ein sogenanntes „Auslaufen der Zellkerne“ (d.h. die Kernfarbstoffe sind nicht mehr auf die Kerne begrenzt) zu minimieren.

#### Inkubation

Während der Inkubation wurden die Objektträger in feuchten Kammern aufbewahrt. Dies verhindert gleichzeitig ein Verdunsten der aufgetragenen Lösungen und ein Ausbleichen der Fluoreszenz-Farbstoffe in den späteren Arbeitsschritten.

Für die Inkubationen wurden die Antikörper, Cy2-Streptavidin, Phalloidin und die Kernfarbstoffe entsprechend ihrer, unter Punkt 5.1.2., 5.1.3. und 5.1.4.

angegebenen, Verdünnungen, mit PBS verdünnt. Anschließend wurde jeder Schnitt mit 50  $\mu\text{l}$  der Verdünnung beschichtet und in die feuchte Kammer gelegt.

### Eindecken

Beim Eindecken wurden mit Mowiol bestrichene Deckgläschen vorsichtig auf den Rand der Objektträger gesetzt und mit einer Pinzette langsam festgedrückt. Hierbei wurden alle eventuellen Luftbläschen unter dem Deckglas entfernt, bevor die Objektträger im Kühlschrank gelagert wurden. Dort polymerisiert das Mowiol aus und bildet einen sicheren Schutz der Schnitte vor Umwelteinflüssen.

### Negativkontrolle

Um falsch-positive Markierungen auszuschließen, wurden bei allen Versuchsreihen Negativkontrollen durchgeführt. Bei diesen Schnitten wurde PBS statt der Primärantikörper aufgetragen. Alle übrigen Arbeitsschritte wurden entsprechend dem Protokoll durchgeführt.

#### **5.2.4. Quantifizierung der Lamin-B1/A-positiven Myozytenkerne**

Die Quantifizierung der, nach dem Färbeprotokoll mit Lamin-B1- und Lamin-A-Antikörpern behandelten Präparate, wurde entsprechend der unter Punkt 6.2.2. beschriebenen Auswertung der TUNEL-positiven Kerne durchgeführt. Hierbei wurden alle im Zählgitter liegenden positiven (grün-fluoreszierenden) und negativen (blau-markierten) Myozytenkerne erfasst. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der Lamin-positiven Myozytenkerne anhand folgender Formel berechnet:

$$\% \text{Lamin - pos. Myoz.} = \frac{\sum \text{Anzahl der Lamin - pos. Myoz.}}{\sum \text{Gesamtzahl der Myoz.}} \times 100$$

*\* Gesamtzahl ergibt sich aus der Summe der pos. und neg. Zellkerne pro Zählgitter.*

#### **5.2.5. Konfokale Lasermikroskopie**

Für eine optimale Bilddokumentation wurde das, über drei Laser verfügende, Konfokale Lasermikroskop TCS SP der Firma Leica eingesetzt. Das Prinzip der Lasermikroskopie beruht auf dem Einsatz von Laserstrahlen, die mit Hilfe eines Prismas und einer Lochblende auf einen bestimmten Wellenbereich eingeschränkt werden. Durch eine weitere brennpunktgleiche (konfokale) Lochblende wird das, zu Unschärfe führende, emittierende Streulicht abgefangen.

Mit Hilfe des Konfokalen Mikroskops wurden bei einer 40-fachen Vergrößerung Serien hergestellt (Schichtbilder im Abstand von 0,2  $\mu\text{m}$ ). Diese wurden im

Rasterverfahren aufgenommen und auf eine Octane-Workstation (Silicon Graphics) übertragen. Dort wurden die digitalen Datensätze mit dem Programm Imaris (Bitplane) zu einem hochaufgelösten Bild verarbeitet und im Programm Selima (Bitplane) gespeichert.

## **6. TUNEL-Methode**

Die in dieser Studie eingesetzte TUNEL-Methode (terminal-deoxy-nucleotidyl-transferase mediated d-UTP nick end-labeling) eignet sich besonders gut für den gezielten Nachweis der Apoptose. Hierbei werden die im Verlauf der Apoptose entstehenden typischen DNA-Fragmente (siehe Punkt 3.2. des Kapitels II) mit Hilfe einer terminalen Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) markiert. Dieses Enzym katalysiert auf „Template-unabhängiger“ Weise die Bindung Digoxigenin-gekoppelter Nucleotide an die 3-OH-Enden der DNA-Fragmente. In einem weiteren Arbeitsschritt werden diese durch einen polyklonalen (Wirt: Schaf) Fluoreszeingekoppelten Anti-Digoxigenin-Antikörper markiert. Anschließend können die grünfluoreszierenden (Extinktion: 523 nm) positiv markierten Kerne mit einem Fluoreszenz-Mikroskop dargestellt werden. Durch den Einsatz des, aus der Digitalis-Pflanze gewonnenen, Digoxigenin und des entsprechend spezifischen Anti-Digoxigenin-Antikörpers wird eine Hintergrundmarkierung verhindert.

### **6.1. Material**

#### **6.1.1. Gewebe**

Zur Bestimmung der TUNEL-positiven Myozyten wurden die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Biopsien (siehe Punkt 1.2.2.5.) untersucht.

#### **6.1.2. Kit**

Alle Schnitte wurden nach dem Arbeitsprotokoll des *in situ* Apoptosis Detection Kits (ApopTag, Fluoreszenz) der Firma Oncor mit den beiliegenden Reagenzien behandelt.

Außerdem wurde bei den Versuchen 4%iges Paraformaldehyd, PBS, Phalloidin, DAPI und Toto 3 gemäß der Beschreibungen unter Punkt 5.1. eingesetzt.

## 6.2. Methode

### 6.2.1. Arbeitsprotokoll der TUNEL-Methode

Für die Studie wurden, wie unter Punkt 5.2.2. beschrieben, Gefrierschnitte von den einzelnen Myokardbiopsien gewonnen und entsprechend dem nachfolgenden Protokoll bearbeitet.

Tab. 7: Arbeitsprotokoll

	Arbeitsschritt	Reagenz	Temp.	Zeit
1	1. Fixierung	PFA	RT	10 min
2	Waschen	PBS	RT	3 x 5 min
3	2. Fixierung	Ethanol-Essigsäure-Puffer	-20°C	5 min
4	Waschen	PBS	RT	3 x 5 min
4a	Verdauung*	DNA'se-Puffer	RT	30 min
4b	Waschen*	PBS	RT	3 x 5 min
5	Äquilibrieren	Äquilibrierungs-Puffer	RT	30 sek
6	1. Inkubation	Reaktionspuffer mit TdT-Enzym	37°C	1,5 h
7	Waschen	Stop/Wash-Puffer <sup>•</sup>	37°C	10 min
8	Waschen	PBS	RT	3 x 1 min
9	2. Inkubation	Anti-Digoxigenin Fluoreszein	RT	30 min
10	Waschen	PBS	RT	3 x 3 min
11	3. Inkubation	Phalloidin	RT	20 min
12	Waschen	PBS	RT	3 x 5 min
13	4. Inkubation	Kernfarbstoffe	RT	20 min
14	Waschen	PBS	RT	3 x 3 min
15	Eindecken	Mowiol	RT	

*RT Raumtemperatur*

\* *nur bei methodischer Positivkontrolle*

• *Gemisch aus 1 ml „Stop and Wash“-Lösung (ApopTag) und 34 ml Aqua dest.*

### Fixierung

Außer der, bei der Immunhistochemie verwendeten Formalinfixierung, wurden die Schnitte in einem Ethanol-Essigsäure-Puffer nachfixiert. Dieser aus einem Gemisch von Ethanol und Essigsäure (2:1) bestehende Puffer wurde vor dem Versuch angesetzt und auf -20°C gekühlt.

### Äquibrierung

Um eine möglichst gleichmäßige Verteilung des TdT-Enzyms zu erreichen, wurden die Präparate vorher mit jeweils 75  $\mu$ l Äquibrierungs-Puffer (ApopTag) behandelt.

#### 1. Inkubation

Kurz vor der Inkubation wurden 33  $\mu$ l TdT-Enzym (ApopTag) mit 77  $\mu$ l Reaktionspuffer (ApopTag) gemischt und auf Eis gelegt. Anschließend wurden die Schnitte mit jeweils 15  $\mu$ l beschichtet, mit einer Plastikfolie bedeckt und in einer feuchten Kammer inkubiert.

#### 2. Inkubation

Die, zur Darstellung der apoptotischen Kerne notwendige Fluoreszenzmarkierung erfolgte während der 2. Inkubation. Hierbei wurden jeweils 20  $\mu$ l einer Mischung aus 49  $\mu$ l Anti-Digoxigenin Fluoreszein (ApopTag) und 56  $\mu$ l Blocking-Lösung (ApopTag) auf die Schnitte pipettiert und mit einer Plastikfolie abgedeckt.

Für die Durchführung der Arbeitsschritte 9 bis 13 gelten die unter Punkt 5.2.3. beschriebenen Erläuterungen.

### Kontrollen

Tab. 8: Kontrollen

	Art der Kontrolle	Arbeitsprotokoll
1	Positive Methodische	Herzgewebe behandelt mit DNA'se
2	Positive Biologische	Schweinedarm
3	Negative Methodische	Herzgewebe ohne TdT-Enzym
4	Negative Biologische	Kontrollherzgewebe

#### Zu 1

Zwei Gefrierschnitte wurden entsprechend dem Protokoll (Tab. 7: 4a und 4b) mit DNA'se (Sigma) in einer Verdünnung von mindestens 1 mg/ml behandelt. Dabei diente die, durch das Enzym bewirkte, DNA-Fragmentierung als Positivkontrolle.

#### Zu 3

Durch das Weglassen des Enzyms während der 1. Inkubation (Tab. 7: Arbeitsschritt 6) lassen sich falsch-positive Markierungen nachweisen.

### 6.2.2. Quantifizierung der TUNEL-positiven Myozytenkerne

Zur Quantifizierung der, nach dem Apop Tag-Protokoll (siehe Punkt 6.2.1.) behandelten Schnitte, wurde ein DM-RB Fluoreszenz-Mikroskop der Firma Leica eingesetzt. Bei diesem Mikroskop werden die Präparate mit der Auflichttechnik untersucht. Hierbei wird das, von einer 100 Watt Quecksilber-Dampf-Lampe (Osram) erzeugte, Licht von oben durch spezifische Filter auf die Objektträger geleitet. Dort führt es zu einer Anregung der Fluoreszenz-Farbstoffe. Da die Filter nur für Licht einer oder mehrerer spezifischer Wellenlängenbereiche durchlässig sind, können die verschiedenen Fluoreszenz-Farben sowohl separat als auch gemeinsam beurteilt werden.

In dieser Studie wurde das Gewebe bei 400facher Vergrößerung mit einem 40fachen Objektiv „HCX PL APO 40x/1.25-0.75 OIL“ und 10fachen Okularen „Periplan GW“ untersucht. Nach dem Einsatz eines Zählgitters in das linke Okular wurden über den ganzen Schnitt verteilt mindestens zehn Gesichtsfelder ausgezählt. Dabei wurden die, durch das ApopTag grün markierten, TUNEL-positiven Myozytenkerne und die Gesamtzahl der Myozytenkerne im Zählgitter erfasst. Die Abgrenzung der Myozytenkerne wurde durch die Doppelmarkierung mit TRITC-konjugiertem Phalloidin und DAPI ermöglicht. Insgesamt wurden nur Zellen berücksichtigt, die eindeutig, aufgrund der Kernform und -lage, sowie des markierten F-Aktins als Myozyten identifiziert werden konnten.

Anschließend wurde der prozentuale Anteil an TUNEL-positiven Myozytenkerne (TUNEL-pos.Myoz.) anhand folgender Formel berechnet:

$$\%TUNEL = \frac{\sum \text{Anzahl der TUNEL - pos. Myoz.}}{\sum \text{Gesamtzahl der Myozytenkerne}} \times 100$$

Die, mit dieser Formel, berechneten Werte wurden durch eine weitere Zählmethode stichprobenartig kontrolliert. Zu diesem Zweck wurden alle TUNEL-positiven Myozytenkerne, sowie die Anzahl an Gesichtsfeldern des gesamten Schnittes gezählt. Außerdem wurde die Gesamtzahl an Myozyten in zehn repräsentativen Gesichtsfeldern bestimmt und darauf basierend die durchschnittliche Myozytendichte pro Gesichtsfeld berechnet. Nachfolgend wurden die Werte in die folgende Formel eingesetzt:

$$\% \text{ TUNEL - pos. Myoz.} = \frac{\sum \text{Gesamtzahl der TUNEL - pos. Myoz.}}{\sum \text{Gesamtzahl der Myozytenkerne}} \times 100$$

### 6.2.3. Konfokale Mikroskopie

Von einigen repräsentativen Schnitten wurden konfokal-mikroskopische Bilder (siehe Punkt 5.2.5.) mit einer 40x Vergrößerung angefertigt. Diese wurden später auf die Octane-Station übertragen, mit Imaris bearbeitet und unter Selima gespeichert.

## 7. Western Blot Analyse

### 7.1. Probenvorbereitung

#### 7.1.1. Material

##### 7.1.1.1. Gewebe

Die Proteinbestimmung mittels Western Blot wurde an den schockgefrorenen Proben (siehe Punkt 1.2.2.5.) nach Homogenisierung durchgeführt.

##### 7.1.1.2. Verbrauchsmaterialien

Homogenisierungspuffer A:	20 mM	Tris-HCL	242 mg
	250 mM	Sucrose	8,56 mg
	1 mM	DTT	15 mg
	1 mM	EGTA	38 mg
	1 mM	EDTA	37,4 mg
	0,5 mM	PMSF	9 mg
	10 mM	NaF	42 mg
	0,1 mM	Sodiumorthovanadat	1,84 mg

Die Substanzen wurden in 100 ml Aqua dest. gelöst und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Homogenisierungspuffer B: Homogenisierungspuffer A + 0,1% Triton

#### Homogenisierungspuffer RIPA

Stammlösung:	10 mM	Tris-HCl (pH 7,4)	1 ml (2M TrisHCl)
	0,15 M	NaCl	1,75 g
	1 mM	Na-Vanadat	36,8 mg
	1 %	Triton-X 100	2 ml
	0,1 %	SDS	2 ml (10% SDS-Lös.)
	1 %	Deoxycholinsäure	2 g

Alle Substanzen wurden gemischt und auf 200 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt.

PMSF-Lösung: 17,4 mgPMSF wurden in 1 ml Isopropanol gelöst (Lagerung:  $-20^{\circ}\text{C}$ )

RIPA-Homogenisierungspuffer: 1 ml Stammlösung +  $5,7 \mu\text{l}$  PMSF-Lösung

### 7.1.2. Methode

Vor der Homogenisierung wurden die Proben mit einer speziellen Zange in flüssigem Stickstoff geteilt. Hierbei wurde darauf geachtet, die zylinderförmigen Myokardbiopsien der Länge nach in zwei möglichst gleich große Stücke zu teilen, um die Proteine in den verschiedenen Homogenisierungspuffern zu extrahieren (Abb. 6).

Im weiteren Verlauf wurden die Gewebestücke gewogen und in der fünffachen Menge mit Extraktionspuffer homogenisiert. Dazu wurden die Proben vorsichtig mit einem Plastikhomogenisator in Eppendorfröhrchen zerkleinert bis eine homogene Lösung entstand. Danach wurden die Proben auf Eis gestellt und entsprechend Abbildung 6 weiterverarbeitet.

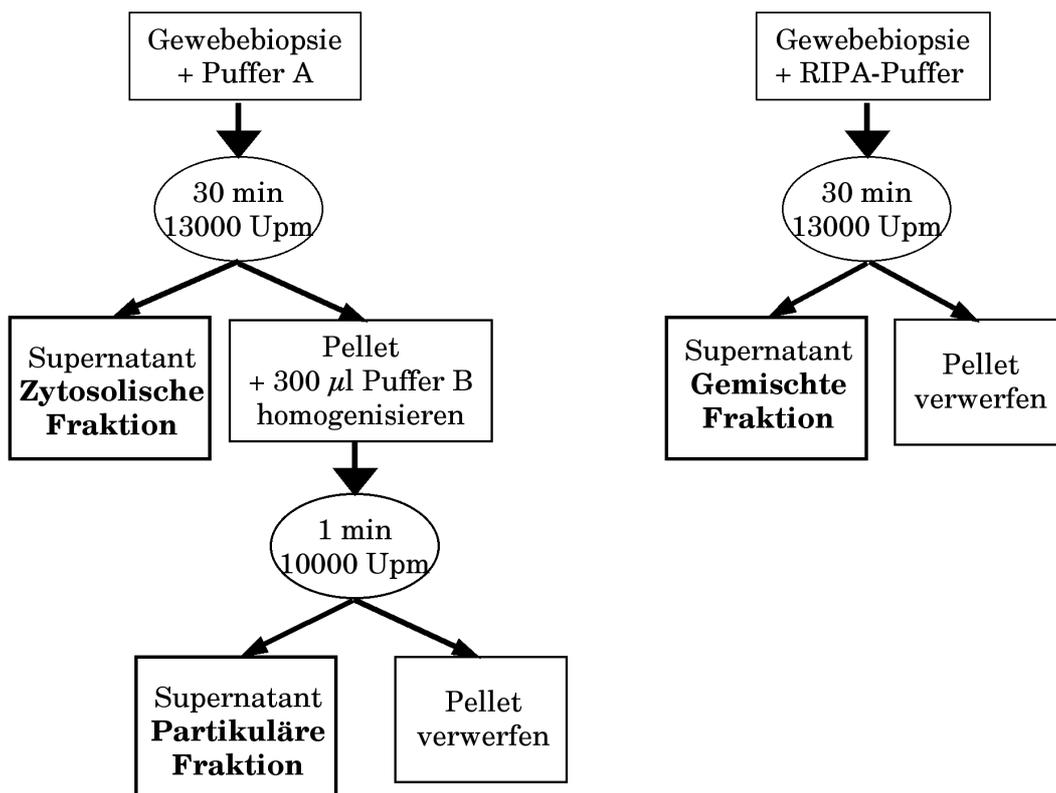


Abb. 6: Arbeitsprotokolle für die Gewinnung der einzelnen Proteinfractionen

Durch den Einsatz der drei verschiedenen Puffer gelingt es, die verschiedenen Fraktionen separat zu gewinnen. Die, mit dem RIPA-Puffer gewonnene, gemischte Fraktion beinhaltet die Proteine der zytosolischen, sowie den größten Teil der Proteine aus der partikulären Fraktion.

## 7.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit dem, auf die Bicinchoninsäure (BCA)-Methode basierenden, BCA 200 Protein-Assay der Firma Pierce (Rockford, USA). Diese, von Smith et al. (1985) und Wiechermann et al. (1988) beschriebene Methode, beruht auf der Fähigkeit von Proteinen, zweiwertiges Kupfer ( $\text{Cu}^{2+}$ ) im alkalischen Milieu durch eine Komplexbindung zu reduzieren. Dieser Komplex bildet mit Bicinchoninsäure ein violettes Farbreagenz, dessen Intensität bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch bestimmt werden kann. Somit kann mit Hilfe einer Standardreihe die Proteinkonzentration der in wässriger Lösung gelösten Proben bestimmt werden.

### 7.2.1. Material

BSA-Stammlösung:	BSA	2	%
	NaCl	155	mM
	$\text{NaN}_3$	8	mM
Reagenz A:	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ , $\text{Na}_4(\text{CO}_3)_2$ , BCA, Natriumtartrat		
	in einer unbekanntten Zusammensetzung (keine Angaben des Herstellers) in 0,2 N Natronlauge.		
Reagenz B:	$\text{CuSO}_4$		
Gebrauchslösung:	49 ml der Reagenz A + 1 ml der Reagenz B		

### 7.2.2. Methode

Für die Erstellung einer Standardreihe wurden mit der BSA (bovines Serumalbumin)-Stammlösung Proteinstandards in einem Konzentrationsbereich zwischen 100  $\mu\text{g/ml}$  und 1000  $\mu\text{g/ml}$  hergestellt. Die unter Punkt 7.1. gewonnenen Fraktionen wurden mit Aqua bidest. 1:50 verdünnt. Anschließend wurden je 100  $\mu\text{l}$  der Proteinstandards (Nullwert: Aqua bidest.) bzw. der verdünnten Proben mit 2 ml Gebrauchsreagenz gemischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach einer Abkühlung auf Zimmertemperatur erfolgte die photometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm in einem 4054 UV Spectrophotometer (LKG Biochrom). Anhand der Regressionsgeraden durch die gemessenen Standardwerte wurden die Proteinkonzentrationen der Proben in  $\mu\text{g}$  pro ml bestimmt und mit Hilfe der folgenden Formel umgerechnet:

$$\text{Proteinkonz. der Probe in } \mu\text{g}/\mu\text{l} = ((\text{Proteinkonz. in } \mu\text{g/ml})/1000) \times 50 \text{ (Verd.)}$$

### 7.3. Arbeitsprotokolle

Da in dieser Studie verschiedene Proteine bestimmt wurden, musste mit einer Vielzahl von Western Blot-Methoden gearbeitet werden. Tabelle 9 fasst die eingesetzten Kombinationen von Puffern, Gelen und Systemen in Bezug auf die einzelnen Proteine zusammen.

Tab. 9: Arbeitsprotokolle für die Western Blots

Proteine	Puffer*	Gele	Systeme	Proben
Calcineurin	Puffer A	15% SDS-TrisHCL-Gele	Bio-Rad	A/B/C/D
Aktin	RIPA-Puffer	10% SDS-Bis-Tris-Gele	Invitrogen	A/B/C/D
alpha-Aktinin	RIPA-Puffer	10% SDS-Bis-Tris-Gele	Invitrogen	A/B/C/D
Bax	RIPA-Puffer	4-12% SDS-Bis-Tris-Gele	Invitrogen	A/B/C/D
Bcl 2	RIPA-Puffer	4-12% SDS-Bis-Tris-Gele	Invitrogen	A/B/C/D
Cytochrom C	Puffer A	4-12% SDS-Bis-Tris-Gele	Invitrogen	A + B
Cytochrom C	Puffer A+B	4-12% SDS-Bis-Tris-Gele	Invitrogen	A + B
Cytochrom C	RIPA-Puffer	4-12% SDS-Bis-Tris-Gele	Invitrogen	A + B

\* Puffer =Homogenisierungspuffer

### 7.4. SDS-Gelelektrophorese

Unter der SDS-Gelelektrophorese versteht man die Proteinauftrennung einer Probe mittels einer ein-dimensionalen Elektrophorese in SDS-Gelen. Bei diesem, von Lämmli (1970) entwickelten, Verfahren werden die Proteine unter denaturierten Bedingungen entsprechend ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Hierzu werden die Proteine mit Lämmli-Puffer (SDS-Puffer) denaturiert, wobei sich das negativ geladene Natriumdodecylsulfat (SDS) an die hydrophoben Teile der Proteine bindet. Diese starke negative Ladung überdeckt die vorhandenen Ladungen und steht in proportionalem Bezug zu der Molekülmasse der Proteine. Außerdem führt diese Ladung in einem elektrischen Feld zu einer Wanderung der Proteine in Richtung Anode. Dabei kommt es infolge des Molekularsiebeffektes durch die kleinen Gelporen zu einer linearen Auftrennung von schneller bewegendem kleinen und „langsameren“ großen Proteinen (Stryer,1990).

### 7.4.1. Material

#### 7.4.1.1. Puffer

Lämmli-Gebrauchspuffer: 950  $\mu$ l Lämmli-Puffer (SDS-Puffer) von Bio-Rad  
50  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol (löst die intra- und intermolekularen Disulfid-Brücken )

Bio-Rad Laufpuffer: 80 mM Glycin  
10 mM TrisHCl  
1 % SDS  
auf einen Liter Aqua dest.

Invitrogen-Laufpuffer: 50 ml MES-Stammlösung (NuPAGE)  
950 ml Aqua dest.

#### 7.4.1.2. Gele

15 % SDS-TrisHCL-Fertiggele (Bio-Rad)  
10 % SDS-Bis-Tris-Fertiggele (NuPAGE, Invitrogen)  
4-12 % SDS-Bis-Tris-Fertiggele (NuPAGE, Invitrogen)

#### 7.4.1.3. Geräte

Elektrophorese-Apparatur der Firma Bio-Rad  
X-Cell SureLock Mini-Cell der Firma Invitrogen

### 7.4.2. Methode

Für die Denaturierung wurden die Proteinfractionen im Verhältnis 2:1 mit dem Lämmli-Gebrauchspuffer verdünnt und nachfolgend für 10 Minuten auf 95°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Proben bis zur endgültigen Verwendung bei -20°C gelagert.

Zu Beginn der Versuche wurden die Kämme der Fertiggele entfernt, und die dadurch entstehenden Taschen mit den entsprechenden Laufpuffern gespült. Danach wurden die vorbereiteten Gele in die gründlich gereinigten Elektrophorese-Apparaturen eingespannt und in die Gelkammern platziert. Diese wurden im weiteren Verlauf vollständig mit den dazugehörigen Laufpuffern aufgefüllt. Die sich nun am oberen Rand der Gele befindenden Taschen wurden mit den zu untersuchenden Proteinproben (jeweils 50  $\mu$ g Gesamtprotein) gefüllt. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurde die erste Tasche jeweils mit 10  $\mu$ l Multi-Marker gefüllt. Dieser Marker zeigt nach der Elektrophorese verschieden gefärbte

Banden, wobei jeder Bande ein spezifisches Molekulargewicht zugeordnet werden kann.

Anschließend wurde die Elektrophorese unter folgenden Bedingungen gestartet:

System	Spannung	Stromstärke	Zeit
Bio-Rad Power-Supply	120 Volt (konstant)	40 mA	1,5 Stunden
Invitrogen PowerEase 500	200 Volt (konstant)	125 mA	45 Minuten

## 7.5. Proteintransfer

Um eine immunologische Darstellung der Proteinbanden zu ermöglichen, müssen die Proteine im Anschluss an die Elektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden. Hierzu werden die aufgetrennten Proteine im sogenannten Tankverfahren elektrophoretisch übertragen.

### 7.5.1. Material

#### 7.5.1.1. Puffer

Bio-Rad-Transfer-Puffer:

20 mM TrisHCl	3,03 g
150 mM Glycin	14,41 g
200 ml Methanol	200 ml

auf 800 ml Aqua dest.

Invitrogen-Transfer-Puffer:

50 ml Transfer-Puffer-Stammlös. (NuPAGE)	
749 ml Aqua dest.	
200 ml Methanol	
1 ml Antioxidanz (NuPAGE)	

TBS (Tris-Base-Saline)-Puffer: siehe Punkt 7.7.1.4.

#### 7.5.1.2. Membranen

Bio-Rad: Nitrozellulosemembran (Amersham Pharmacia)  
 Invitrogen: Nitrozellulosemembran (Novex)

### 7.5.2. Methode

Nach vollständiger Auftrennung der Proteine wurden die Gelkassetten mit einem speziellen Messer geöffnet, und die Gele vorsichtig herausgelöst. Nachfolgend wurde die Anodenkammer entsprechend der Abbildung 7 bepackt und in die Transfer-Kammer eingespannt. Dabei wurden die, in Transfer-Puffer getränkten,

Schwämme, Filterpapiere und Nitrozellulosemembranen in der dargestellten Reihenfolge gestapelt (Abb. 7). Mit Hilfe einer Glaspipette wurden sie einzeln glattgestrichen, um eventuelle Luftblasen zu entfernen.

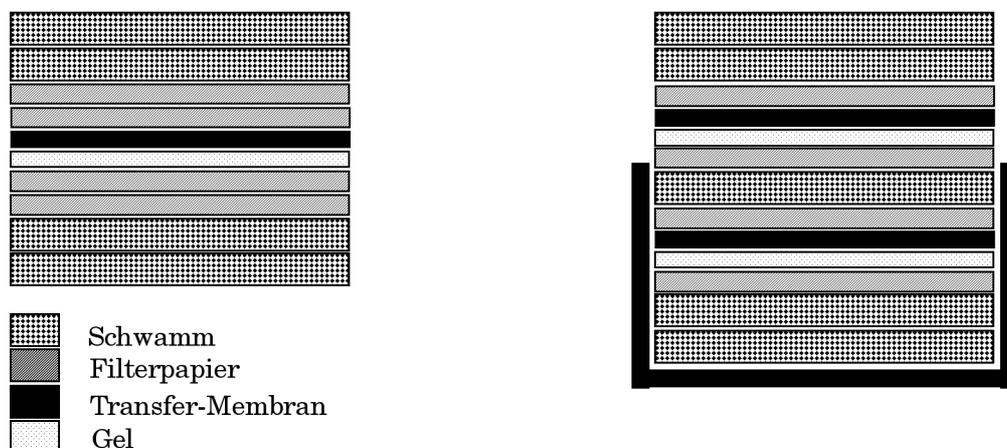


Abb. 7: Reihenfolge der gepackten Anodenkammer (links: BIO-Rad; rechts: Invitrogen)

Der im Anschluss durchgeführte Proteintransfer erfolgte unter folgenden Bedingungen:

System	Stromstärke	Spannung	Zeit
Bio-Rad Power-Supply	200 mA (konstant)	6-7 Volt	2,5 Stunden
Invitrogen PowerEase 500	125 mA	200 Volt (konstant)	70 Minuten

## 7.6. Proteinnachweis

Die erfolgreiche Auftrennung und Übertragung der Proteine wurde mit Hilfe einer reversiblen Ponceau-Färbung nachgewiesen und dokumentiert.

### 7.6.1. Material

Ponceau- Lösung (Sigma, Deisenhofen)

TBS-Puffer siehe Punkt 7.7.1.4

### 7.6.2. Methode

Bei der Ponceau-Färbung wurden die Membranen mit Ponceau-Lösung beschichtet und 1 Minute bei Zimmertemperatur inkubiert. Direkt anschließend wurden sie mit Aqua dest. gespült, bis sich deutlich getrennte Proteinbanden darstellten (Abb. 8). Die, so reversibel rot gefärbten, Membranen wurden in Folie eingepackt, mit einem Scanner dokumentiert und danach mit TBS wieder vollständig entfärbt.

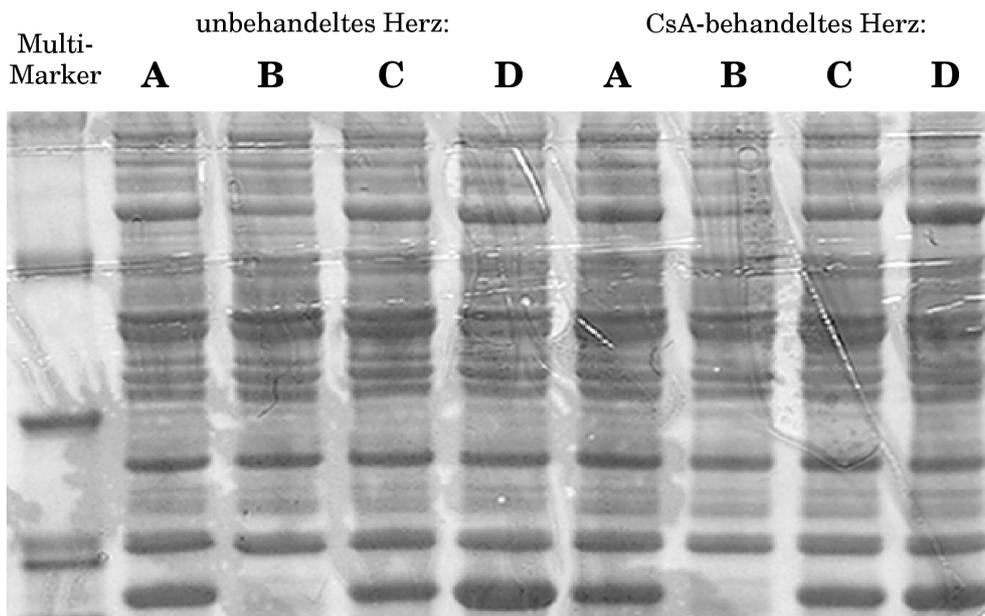


Abb. 8: Die Abbildung zeigt die gleichmäßige Auftrennung der Proteine an einer Ponceau-gefärbten Membran.

## 7.7. Immunologische Darstellung der Proteine

### 7.7.1. Material

#### 7.7.1.1. Primäre Antikörper

Zur Darstellung der spezifischen Proteinbanden wurden beim Western Blot-Verfahren folgende monoklonale und polyklonale Antikörper verwendet.

Tab. 10: 1. Antikörper

Antikörper	Klon	Wirt	Verd.	Molek.gew.*	Hersteller
alpha-Aktinin	EA-53	Maus	1:800	100 kDa	Sigma
Aktin	HF-35	Maus	1:300	43 kDa	Dako
Calcineurin **	VA-1	Maus	1 $\mu$ g/ml	17 kDa	Upstate Biotechnology
Cytochrom C		Maus	1:1000	12,3 kDa	Upstate Biotechnology
Cytochrom C	H-104	Kaninchen	1:300	12,3 kDa	Santa Cruz
Bax		Maus	1:300	21 kDa	Santa Cruz
Bcl-2	C-2	Maus	1:300	28 kDa	Santa Cruz

\* Das Molekulargewicht des gebundenen Proteins gibt an, bei wieviel Kilodalton (kDa) die Bande zu finden ist.

\*\* Dieser Antikörper richtet sich gegen die B-Untereinheit des Calcineurins.

### 7.7.1.2. Sekundäre Antikörper

Während der 2. Inkubation wurden ausschließlich mit „horse-radish“ Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper eingesetzt.

Tab. 11: 2. Antikörper

Antikörper	Wirt	Hersteller
Goat-Anti-Mouse-IgG	Ziege	New England Biolabs
Goat-Anti-Rabbit-IgG	Ziege	New England Biolabs

### 7.7.1.3. Detektionssystem

Im weiteren Verlauf wurden die gebundenen Antikörper mit dem ECL-Western-Blot-Detection-Kit der Firma Amersham Pharmacia Biotech nachgewiesen. Hierbei führt die, durch die Peroxidase hervorgerufene Oxidation der ECL-Reagenzien zu einer Abgabe von Licht im proportionalen Verhältnis zu der Menge an gebundenem Protein. Dieses Licht kann mit radiographisch sensitiven Filmen (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech) nachgewiesen werden.

### 7.7.1.4. Verbrauchsmaterialien

TBS –Puffer:                    0,5    M    Tris-HCl        2,62 g  
     1        M    NaCl             8        g  
     gelöst in 1 Liter Aqua dest. bei einem pH-Wert von 7,4

Blocking-Agent (Amersham Pharmacia Biotech): Magermilchpulver

„Stripping“-Puffer:        100    mM    2-Mercaptoethanol        1,66 ml  
     2        %    SDS                        4        g  
     62,5   mM    TrisHCl (1M; pH 6,7)    62,5   ml  
     auf 200 ml Aqua bidest.

### 7.7.1.5. Geräte

Für eine qualitative und quantitative Auswertung wurden die Filme mit einer Medicine 260-Entwicklungsapparatur belichtet und in einem Phosphoimager Storm 860 (Molecular Dynamics) ausgewertet.

## 7.7.2. Methode

### 7.7.2.1. Immunologischer Nachweis der Proteine

Die mit Aqua dest. entfärbten Membranen wurden für die folgenden Arbeitsschritte (Tab. 12) in beschriftete 50 ml-Falconröhrchen verpackt.

Tab. 12: Arbeitsprotokoll für den immunologischen Nachweis der Proteine

	Arbeitsschritt	Reagenz	Temp.	Zeit
1	1. Inkubation	5% Blocking-Lös.	- 4°C	über Nacht
2	Waschen	TBS	RT	3 x 15 min
3	2. Inkubation	1.Antikörper	-4°C	über Nacht
4	Waschen	TBS	RT	3 x 15 min
5	3. Inkubation	2.Antikörper	RT	2 h
6	Waschen	TBS	RT	3 x 15 min
7	Entwicklung	ECL-Reagenz	RT	1 min

#### 1. Inkubation

Um die unspezifischen Bindungsstellen der Nitrozellulosemembranen zu blockieren, wurden die Membranen über Nacht in einer Kühlkammer mit 5 ml einer 5%igen Blockinglösung (0,25 g Blocking-Agent in 5 ml TBS) inkubiert.

#### 2. Inkubation

Bei der 2. Inkubation wurden die Primärantikörper entsprechend ihrer Verdünnung in 3 ml 1%iger Blockinglösung (0,03 g Blocking-Agent in 3 ml TBS) gelöst.

#### 3. Inkubation

Für ein möglichst gutes Signal und einen geringen Background wurden die Sekundärantikörper 1:3000 mit 6 ml einer 3%igen Blockinglösung (0,18 g Blocking-Agent in 6 ml TBS) verdünnt.

#### Entwicklung

Nach dem Waschen wurden die Membranen kurz bei Raumtemperatur getrocknet und für eine Minute mit 5 ml ECL-Gebrauchslösung (1:1-Gemisch aus Reagenz A und B) bedeckt. Im Anschluss wurde die abgetropfte Nitrozellulosemembran in Folie eingepackt und in eine Röntgenfilmkassette geklebt. In diese wurde dann ein unbelichteter Hyperfilm gelegt und für 2 bzw. 15 Minuten belichtet.



### 8.1.3. Verbrauchsmaterialien

#### Extraktionspuffer

Bei der Herstellung wurde 0,21 g MOPS (0,1 mol/l) in 10 ml Aqua dest. gelöst und mit NaOH ein pH-Wert von 7 eingestellt. Später wurde unter konstantem Rühren 7,4 mg EDTA, 1,74 mg PMSF, sowie eine Mini-complete-Tablette (Inhibitor-Komplex, Boehringer-Ingelheim) hinzugefügt.

Protein-Kinase-A-Puffer:	50	mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	10	mM	MgCl <sub>2</sub>
	1	mM	EGTA
	2	mM	DTT
	0,01	%	Brij 35

Substratpuffer:	50	mM	Tris HCl (pH 8,5)
	0,1	mM	Na <sub>2</sub> EDTA
	2	mM	DTT
	0,01	%	Brij 35

Dialysis-Puffer:	25	mM	TrisHCl (pH 7,5)
	0,1	mM	Na <sub>2</sub> EDTA
	2	mM	DTT
	0,01	%	Brij 35

Protein-Phosphatase-Puffer:	50	mM	Tris HCl (pH 7,0)
	0,1	mM	Na <sub>2</sub> EDTA
	5	mM	DTT
	0,01	%	Brij 35

#### Basispuffer

Für den Basispuffer wurden folgende Substanzen in der angegebenen Konzentration in Aqua dest. gelöst:

40 mmol/l TrisHCl, 100 mmol/l KCl, 0,5 mmol/l Dithiotreitol.

Anschließend wurde 0,1 mg BSA pro ml Lösung hinzugefügt und ein pH-Wert von 8 eingestellt.

Reaktionspuffer A: Basispuffer + 0,1 mmol/l CaCl<sub>2</sub> + 100 nmol/l Calmodulin

Reaktionspuffer B: Reaktionspuffer A + 500 nmol/l Okadaic-Säure

Reaktionspuffer C: Reaktionspuffer B + 1 μmol/l Cyclosporin A + 1 μmol/l Cyclophilin

ATP: (gamma-<sup>32</sup>P)-ATP (Amersham Pharmacia Biotech)

PKA/MBP-Mix: PSP-Assay, New England Biolabs

Tri-Chlor-Säure (TCA): 100% und 20%

Scintillationscocktail: Rothsint eco plus (Roth)

#### 8.1.4. Geräte

Zur Auswertung der Radioaktivität wurde ein Liquid-Scintillation-Analyser der Firma Packard verwendet.

### 8.2. Methode

#### 8.2.1. Probenvorbereitung und Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Probenvorbereitung entsprach weitgehend der unter Punkt 7.1. beschriebenen Prozedur bei der Western Blot-Technik. Die Gewebestücke wurden gewogen und in der fünffachen Menge Extraktionspuffer homogenisiert. Während der Homogenisierung wurden die Proben kontinuierlich auf Eis gekühlt, um einen Aktivitätsverlust der Enzyme möglichst zu vermeiden. Danach wurden die Eppendorfröhrchen bei 4°C und 13000 UPM 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand abpipettiert.

Später wurden die Proteinkonzentrationen aller Proben mit dem unter Punkt 7.2. erläuterten BCA 200 Protein-Assay bestimmt.

#### 8.2.2. Radioaktive Phosphorylierung des Myelin-Basic-Proteins

Vor der eigentlichen Aktivitätsmessung mussten die Serin- und Threonin-Bindungsstellen des MBP mit (gamma-<sup>32</sup>P)-ATP radioaktiv markiert werden. Hierzu wurden 40 µl PKA/MBP-Mix in 135 µl Protein-Kinase-A-Puffer gelöst und, in Anwesenheit von 20 µl ATP (PSP-Assay, New England Biolabs) und 5 µl (gamma-<sup>32</sup>P)-ATP, bei 30°C für 16 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 25 µl 100%ige TCA gestoppt und das ausgefällte Protein bei 4°C und 12000 UPM (10 Minuten) abzentrifugiert. Da das nicht-verbrauchte (gamma-<sup>32</sup>P)-ATP nach der Zentrifugation nur zu 90% entfernt wurde, musste das gewonnene Pellet noch dreimal in 1 ml 20%ige TCA resuspendiert und 5 Minuten bei 12000 UPM zentrifugiert werden. Danach wurde das, in 0,5 ml Substratpuffer resuspendierte, Pellet in einen Dialyse-Schlauch gepackt und in einer mit Dialyse-Puffer gefüllten Glaswanne inkubiert. Der Dialyse-Schlauch besteht aus einer semipermeablen Membran, die aufgrund ihrer Porengröße nur für Moleküle bis zu einer Molekülgröße von 10000 Da durchlässig ist. Dabei trat (gamma-<sup>32</sup>P)-ATP entsprechend des Konzentrationsgefälles aus dem Schlauch heraus, während das radioaktive MBP durch die Membran zurückgehalten wurde. Nach 16 Stunden mit häufigem Wechsel des Puffers konnte das, nahezu vollständig aufgereinigte, markierte MBP aus dem Substratpuffer gewonnen und mit Protein-Phosphatase-Puffer auf eine Endkonzentration von 50 µM verdünnt werden.

### 8.2.3. Messung der Calcineurinaktivität

Um eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Protein-Phosphatasen (PP)-Aktivitäten zu ermöglichen, wurden die Messungen in unterschiedlichen Reaktionspuffern (jeweils im Doppelansatz) durchgeführt. Dabei wurde zuerst die Gesamtaktivität der Calcium/Calmodulin-abhängigen Protein-Phosphatasen in Anwesenheit von Calcium und Calmodulin (Reaktionspuffer A) bestimmt. In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Aktivität von PP-1 und PP-2A mit dem spezifischen Inhibitor Okadaic-Säure (Reaktionspuffer B) geblockt. Und schließlich wurden in Reaktionspuffer C alle Protein-Phosphatasen mit Hilfe von Okadaic-Säure und CsA/Cyclophilin als Inhibitor-Komplex von Calcineurin vollständig gehemmt.

Zu Beginn des Versuchs wurden 30  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer (A,B oder C) mit 10  $\mu\text{l}$  Homogenat und 10  $\mu\text{l}$  (gamma- $^{32}\text{P}$ )-MBP gemischt und bei 30°C für 10 Minuten inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurde die Reaktion in Abwesenheit von Proteinhomogenat gemessen. Anschließend wurde die Reaktion mit 200  $\mu\text{l}$  20%igem kaltem TCA gestoppt und, nach 10 Minuten auf Eis, bei 12000 UPM für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurden 200  $\mu\text{l}$  Überstand sorgsam abpipettiert, in 5 ml Scintillationscocktail gelöst und mit dem Liquid-Scintillation-Analyser ausgewertet.

Zur Berechnung der Calcineurinaktivität wurde die Differenz der gemessenen Radioaktivität in Ab- und Anwesenheit von CsA/Cyclophilin gebildet. Zuletzt wurde anhand der ermittelten Proteinkonzentrationen die spezifische Aktivität der jeweiligen Proben bestimmt.

## 9. Auswertung und Statistik

Die Datenaufbereitung, Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms Excel (Microsoft Corporation), wobei alle Ergebnisse als Mittelwerte mit zugehörigen Standardfehlern dargestellt wurden. Die vergleichende Statistik wurde mit Hilfe von SigmaStat durchgeführt. Die verwendeten Tests waren bei gegebenen Voraussetzungen die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) bzw. bei abhängigen Stichproben die Varianzanalyse für Messwiederholungen (RM ANOVA), andernfalls kamen Kruskal-Wallis-Test bzw. Friedman-Test zum Zuge. Zum Vergleich zweier Gruppen wurde der t-Test für unabhängige bzw. abhängige Stichproben oder alternativ der Mann-Whitney- bzw. Wilcoxon-Test benutzt. In allen Fällen galt ein Ergebnis mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  als signifikant.



## IV. ERGEBNISSE

### 1. Funktionelle Erholung

Nach Anschluß der Herzen an die Empfängertiere wurde die Herztätigkeit mittels Defibrillation wiederhergestellt. Dabei dienten direkt nach der Entnahme reperfundierte Herzen als Kontrolle. Die danach im stündlichen Abstand gemessenen Funktionsparameter ergaben den, in Abbildung 9 dargestellten, Verlauf der end-systolischen Elastizität. Diese lag nach der direkten Übertragung der Spenderherzen in der ersten Stunde bei 23 mmHg/mm und zeigte während der folgenden sechs Stunden der Reperfusion keine signifikanten Veränderungen ( $t = 6h$ ; 24 mmHg/mm). Im Vergleich dazu setzten die Herzkontraktionen in der unbehandelten Gruppe nur mit 50% der end-systolischen Elastizität (14 mmHg/mm) ein. In der nachfolgenden Reperfusionphase kam es nicht zu einer Erholung und auch nach sechs Stunden lag die end-systolische Elastizität trotz kleiner Schwankungen bei 50% des Kontrollwertes (14 mmHg/mm). Bezüglich der berechneten end-systolischen Elastizität für die mit CsA perfundierten Herzen fand sich ein kontinuierlicher Verlauf auf dem Niveau der Kontrollwerte. Nach 18 Stunden globaler Ischämie lagen die ersten Messungen bei 23 mmHg/mm und endeten sechs Stunden später bei 22 mmHg/mm. Folglich wurde durch die Behandlung mit Cyclosporin A, im Gegensatz zur unbehandelten Gruppe, eine vollständige funktionelle Erholung erreicht.

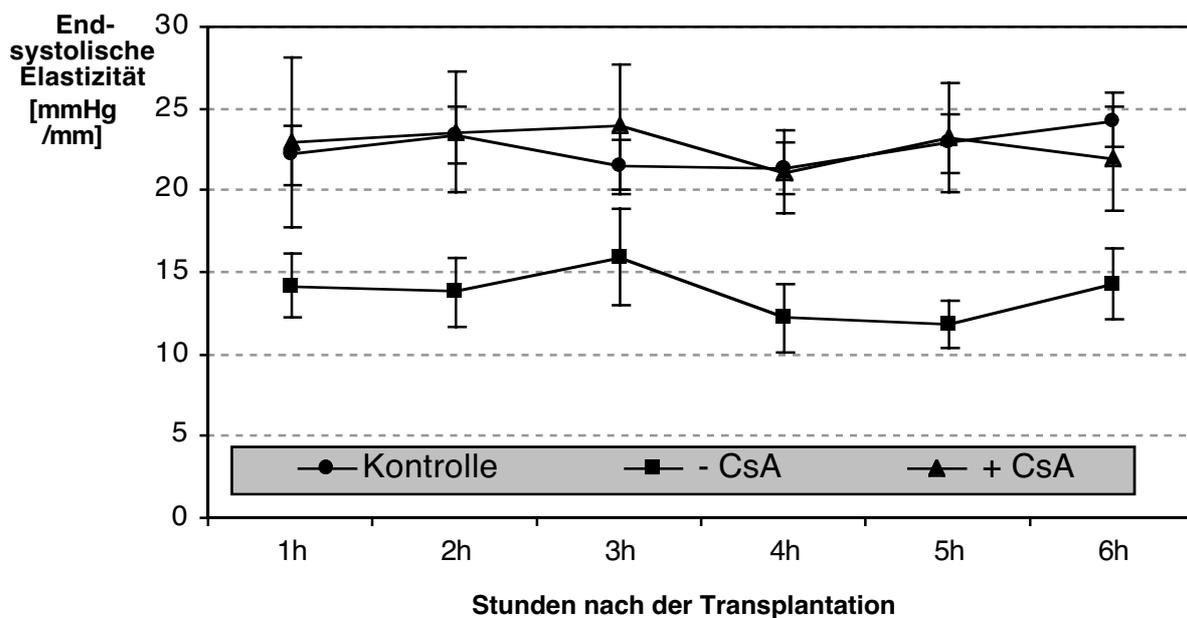


Abb. 9: **End-systolische Elastizität (ESE)** als Maß für die funktionelle Erholung während der 6 stündigen Reperfusion. Die Resultate für die drei verschiedenen Gruppen sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

## 2. Gehalt an Adenin-Tri-Phosphat (ATP)

Der Gehalt an ATP in den während des Versuchs entnommenen Biopsien ist in Abbildung 10 dargestellt. In den nicht mit CsA perfundierten Tieren fiel der ATP-Gehalt während der Ischämie von 16 auf  $10 \mu\text{mol/g}$  Trockengewicht (TG). Diese 40%ige Abnahme änderte sich im Verlauf der Reperfusion nur unmerklich, und gegen Ende des Versuchs lag der Wert immer noch bei  $10 \mu\text{mol/g}$  TG. Einen entsprechenden Verlauf zeigten die ATP-Werte der behandelten Herzen. Hierbei kam es in den mit CsA perfundierten Herzen zu einer ca. 45%igen Herabsetzung des ATP-Gehaltes von 16 auf  $8,5 \mu\text{mol/g}$  TG und nach sechs Stunden Reperfusion zu einem Endgehalt von  $8 \mu\text{mol/g}$  TG.

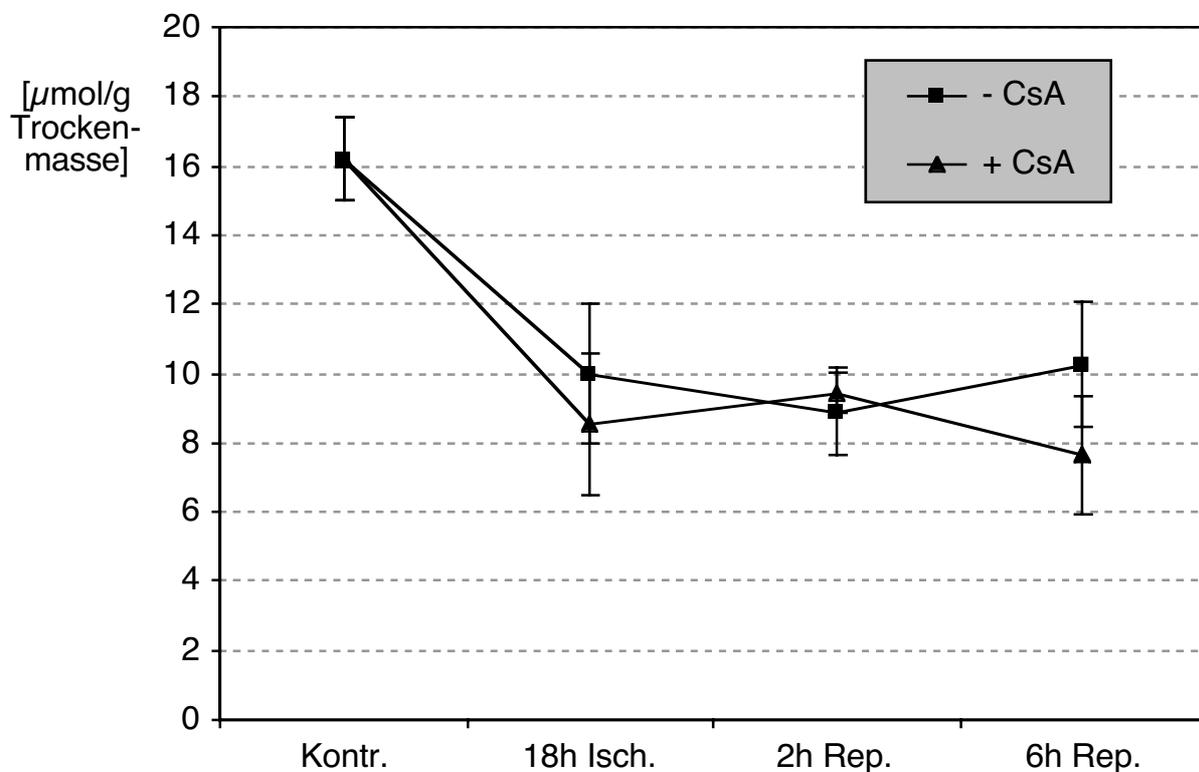


Abb. 10: Der mittels HPLC ermittelte **ATP-Gehalt** zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben.

### 3. Elektronenmikroskopie (EM)

Die für die Elektronenmikroskopie angefertigten Schnitte wurden hinsichtlich zweier Kriterien bearbeitet.

#### 3.1. Grad der ischämischen Schädigung

Bei der Beurteilung des ischämischen Schädigungsgrades wurden die Präparate nach den von Schaper et al.<sup>10,38</sup> beschriebenen Kriterien in die folgenden vier Kategorien eingeteilt (Abb. 11A-D).

Tab. 13: Einteilung der Schädigungsgrade

Grad der Schädigung	Veränderungen der Zellorganellen
Kontrolle	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Die Mitochondrien weisen eine dunkle Matrix mit normaler Granula und intakten Cristae auf.</li> <li>- Die Kerne besitzen fein verteiltes Chromatin.</li> <li>- Es ist reichlich Glykogen vorhanden.</li> </ul>
Leichte reversible Schädigung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Die Matrix der Mitochondrien ist leicht aufgehellt und die dunkle Granula fehlt. Es gibt kaum veränderte Cristae.</li> <li>- Einzelne Kerne zeigen eine leichte Schwellung.</li> <li>- Es ist reichlich Glykogen vorhanden.</li> </ul>
Schwere reversible Schädigung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- In der stark aufgehellten Matrix der Mitochondrien finden sich zahlreiche fragmentierte Cristae.</li> <li>- Das Chromatin in den schwer geschwollenen Zellkernen ist verklumpt.</li> <li>- Glykogen ist kaum noch vorhanden.</li> <li>- Oft sind extrazelluläre Ödeme erkennbar.</li> </ul>
Irreversible Schädigung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Neben den Veränderungen der schweren reversiblen Schädigung enthalten die Mitochondrien „flocculent densities“.</li> <li>- Die Kerne sind stark ödematös mit vollständig verklumptem Chromatin.</li> <li>- Glykogen ist nicht mehr vorhanden.</li> <li>- Regelmäßig auftretende intra- und extrazelluläre Ödeme.</li> </ul>

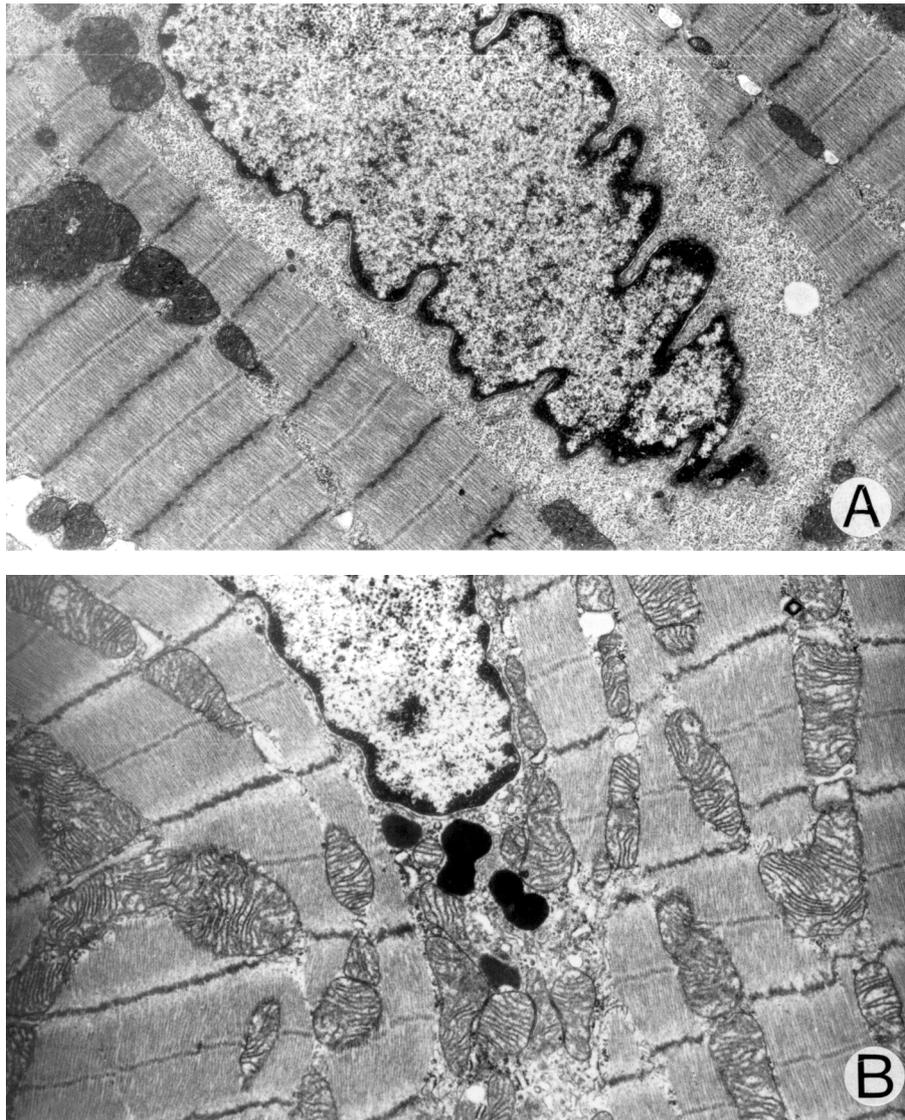


Abb. 11

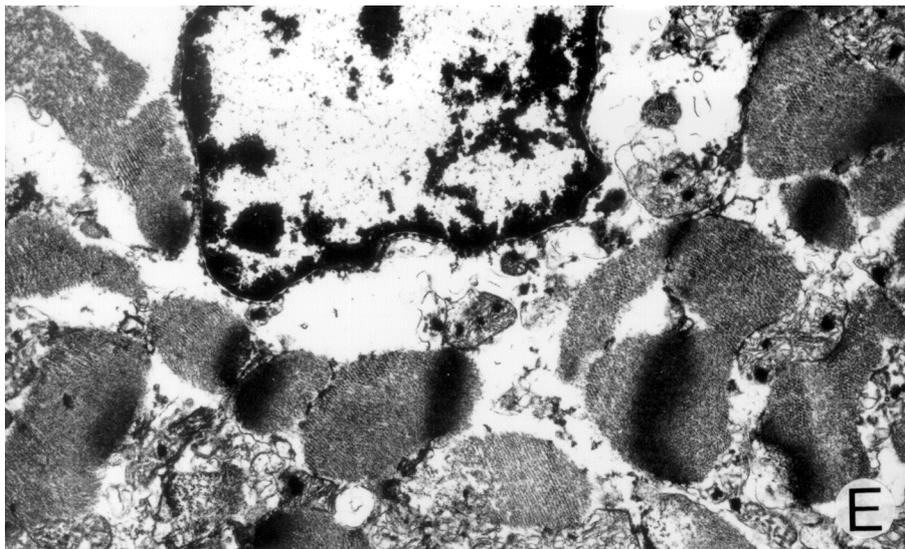
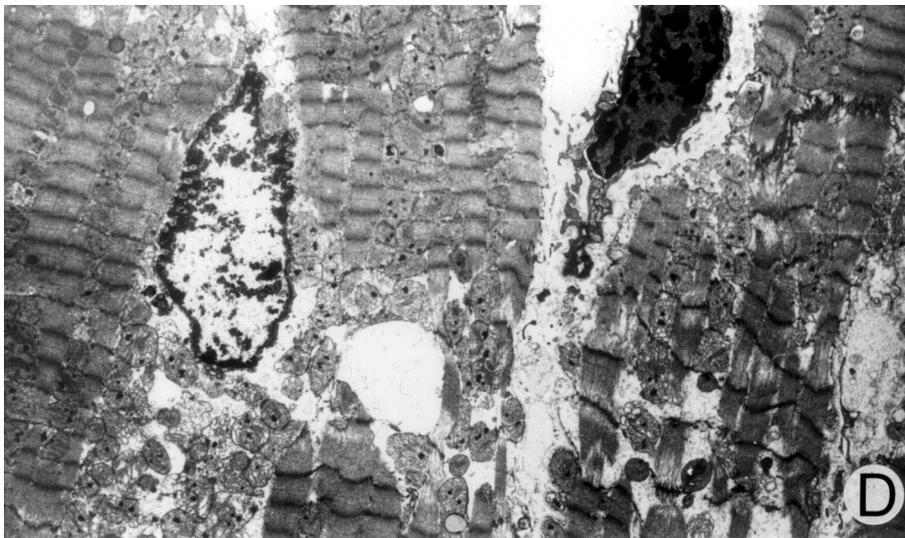
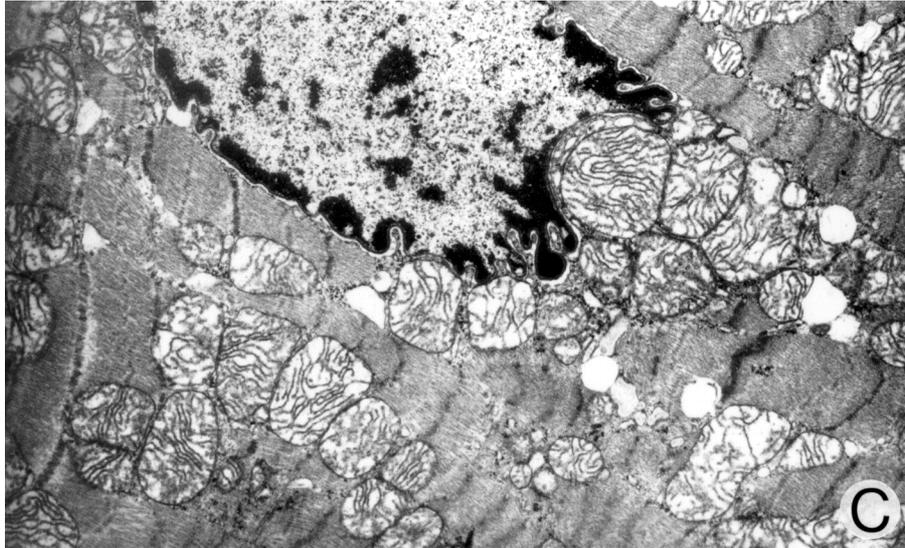
**A:** Normales Myokard. Die Mitochondrien sind dunkel gefärbt mit intakten Cristae, und das Chromatin im Zellkern ist fein verteilt. Die regelmäßige Anordnung der Z- und M-Linien sind gut zu erkennen.

**B:** Leichte reversible Schädigung des Myokards. Die Mitochondrienmatrix und der Kern sind leicht aufgehellt. Aber die Cristae sind weitgehend intakt.

**C:** Schwere reversible Schädigung des Myokards. Die Mitochondrien und der Kern sind stark geschwollen und aufgehellt. Das Chromatin des Kerns ist verklumpt und randständig.

**D:** Irreversible Schädigung des Myokards. In den Mitochondrien befinden sich „flocculent densities“. Außerdem sind die Cristae der Mitochondrien durch die starke Schwellung vermindert und fragmentiert (siehe auch Abb. 11E). Der Kern ist ödematös mit vollständig verklumptem Chromatin.

**E:** Vergrößerung des irreversibel geschädigten Myokards. Die Mitochondrienmatrix ist stark aufgehellt und die Mitochondrien enthalten sog. elektronendichte „flocculent densities“.



Aus der Einteilung ist erkennbar, dass der Schädigungsgrad durch die unterschiedliche Beteiligung der Zellorganellen bestimmt wird. Dabei reagieren die, als „Kraftwerke“ der Zelle bezeichneten, Mitochondrien am empfindlichsten auf die Ischämie. Es kommt je nach Grad der Schädigung zu einer Auflösung der Granula, Aufhellung der Matrix und Fragmentierung der Cristae (Abb. 11B-E). Im Falle einer irreversiblen Schädigung bilden sich in den Mitochondrien sogenannte „flocculent densities“. Diese Strukturen stellen sich als große, elektronendichte, unregelmäßig geformte Flecken dar und bestehen wahrscheinlich aus Restprodukten der aufgelösten Mitochondrienmembranen (Abb. 11E).

Die Veränderungen in den Kernen treten immer erst später auf, wobei es zu einer Schwellung des Kerns und im weiteren Verlauf zu einer Verklumpung des Chromatins kommt (Abb. 11C-D).

Bei den untersuchten Hunden fanden wir keinerlei Veränderungen in sämtlichen, vor der Ischämie entnommenen, Kontrollbiopsien. Im Gegensatz dazu zeigt die Tabelle 14 die Verteilung der Hunde nach 18stündiger globaler Ischämie. Auffällig war der weitaus geringere Anteil an ischämischen Schäden in den mit CsA perfundierten Herzen. Während in der unbehandelten Gruppe fünf Präparate Merkmale einer schweren reversiblen Schädigung aufwiesen, waren in der behandelten Gruppe keine schweren reversiblen Veränderungen erkennbar. Dafür überstanden drei Herzen dieser Gruppe die Ischämie ohne Anzeichen einer Schädigung. In den folgenden sechs Stunden der Reperfusion kam es in einigen Herzen zu einer strukturellen Erholung. Allerdings lag diesbezüglich keine Korrelation zwischen dem Verlauf der Erholung und der Behandlung mit CsA vor. Zusammengefasst weisen die ultrastrukturellen Veränderungen auf einen deutlichen protektiven Effekt des CsA's während der Ischämie.

Tab. 14: Elektronenmikroskopisch beurteilter Schädigungsgrad des Myokards nach 18 Stunden Ischämie. Die Zahlen entsprechen der Anzahl von Hunden pro Kategorie.

Grad der Schädigung	- CsA	+ CsA
ohne Anzeichen einer Schädigung	0	3
leichte reversible Schädigung	1	3
schwere reversible Schädigung	5	0
irreversible Schädigung	0	0

### 3.2. Apoptose und Nekrose

Außer der unter Punkt 3.1. beschriebenen Einteilung wurden alle Präparate auf das Vorhandensein von apoptotischen und nekrotischen Zellen untersucht. Dabei wurde vor allem auf die in der Tabelle 15 zusammengefassten charakteristischen Merkmale des jeweiligen Zelltodes geachtet.

Tab. 15: Morphologische Merkmale des Zelltodes

Apoptose	Nekrose
Membranintegrität bleibt erhalten	Verlust der Membranintegrität
Schrumpfen des Kerns, wobei das Chromatin stark kondensiert wird	Anschwellen des Kerns und Dekondensation des Chromatins
Zellkondensation: Zellen schrumpfen	Schwellung der gesamten Zelle
Organellen bleiben intakt	Desintegration und Anschwellen der Zellorganellen
Bildung von „apoptotic bodies“	Bläschenbildung

*„apoptotic bodies“ = membrangebundene Vesikel, die intakte Mitochondrien enthalten*

In keinem der angefertigten Schnitte wurden nekrotische oder apoptotische Zellen gefunden. Ebenso wenig waren Anzeichen einer mit Nekrose einhergehenden Entzündung erkennbar. Diese Ergebnisse weisen auf die Abwesenheit von Nekrose in dem verwendeten Modell. Allerdings lässt sich eine endgültige Aussage nur in Verbindung mit den immunhistochemischen Ergebnissen der Complement C9 Färbung machen, da der elektronenmikroskopisch untersuchte Gewebeausschnitt sehr klein ist. Gleiches gilt für die Apoptoserate, wobei diesbezüglich nur die Resultate der TUNEL-Methode und der Lamin-Immunhistochemie ausschlaggebend sind.

## 4. TUNEL-positive Myozyten

Zur Quantifizierung der TUNEL-positiven Myozyten wurden pro Präparat mindestens zehn repräsentative Gesichtsfelder mit Hilfe eines Zählgitters ausgewertet. Durch die deutliche Doppelmarkierung von F-Aktin und den Kernen konnten die Myozyten eindeutig identifiziert und quantifiziert werden (Abb. 13B). Im Anschluss wurden die prozentualen Anteile an TUNEL-positiven Myozyten anhand der Formel unter Kapitel III Punkt 6.2.2. berechnet. Die Mittelwerte zu den einzelnen Zeitpunkten werden in der Abbildung 12 präsentiert.

Es war offensichtlich, dass in der Kontrollbiopsie beider Gruppen keine TUNEL-positiven Kerne vorlagen. Aber auch direkt nach der Ischämie wurden in keinem der Präparate positiv-markierte Myozytenkerne nachgewiesen. Erst im Verlauf der Reperfusion kam es zu einem signifikanten Anstieg an positiven Kernen. Hierbei stieg der prozentuale Anteil in der CsA-freien Gruppe von 0% auf 2,5% nach 2h Reperfusion und auf 5,9% nach 6h Reperfusion (Abb. 12). Im Gegensatz dazu kam es durch den Zusatz von CsA zu einer 50% geringeren Apoptoserate. In dieser Gruppe fanden sich nach 2h Reperfusion 1,5% und nach 6h Reperfusion 2,44% positive Myozyten (Abb. 13C-D). Die biologischen und methodischen Negativkontrollen zeigten keinerlei positive Markierungen. Dahingegen waren im Schweinedarm (Abb. 13A) und im DNA'se behandelten Herzpräparat eine Vielzahl grün-markierter Kerne erkennbar.

Die stichprobenartig durchgeführten Kontrollzählungen der gesamten Schnitte ergaben in allen Fällen Mittelwerte, die um höchstens 0,05% von den oben berechneten Werten abwichen.

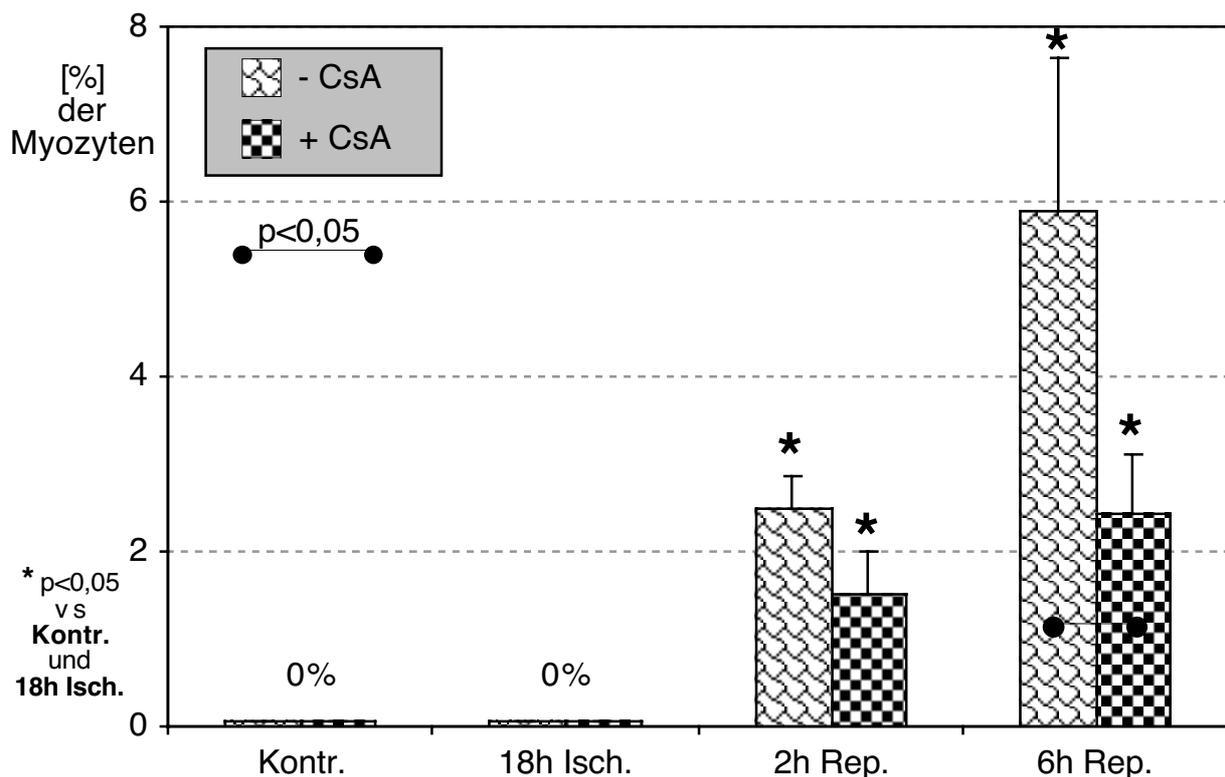


Abb. 12: Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil an **TUNEL-positiven Myozytenkernen** als Mittelwert zu den Probezeitpunkten  $\pm$  SEM. Durch die Gabe von CsA kommt es zu einer signifikanten Reduktion an positiven Myozyten nach 6h Reperfusion im Vergleich zu den unbehandelten Herzen.

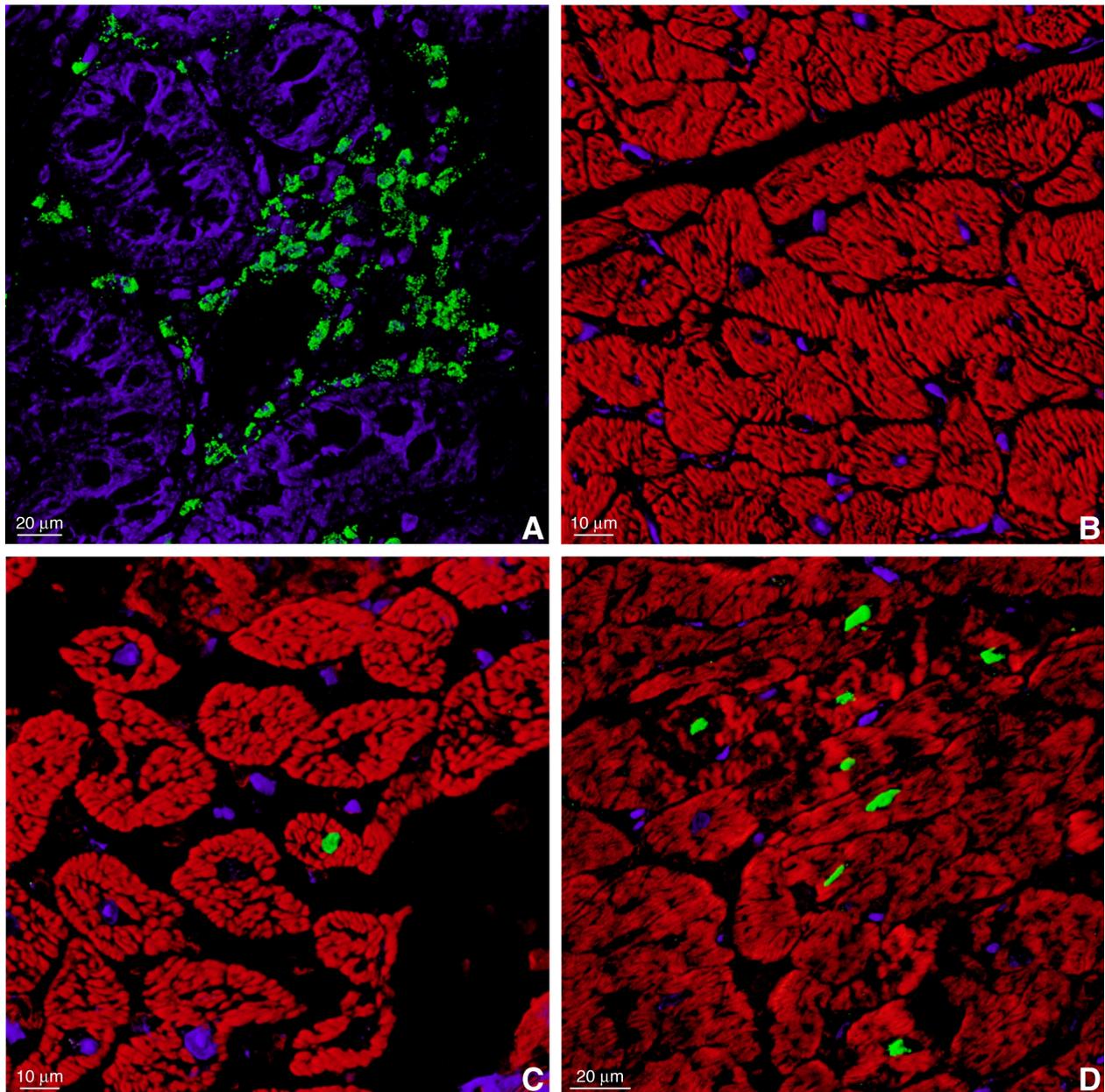


Abb. 13: TUNEL-Nachweis mittels konfokaler Mikroskopie

**A:** Positive Kontrolle, apoptotische Kerne grün (Schweinedarm)

**B:** Kontrolle ohne apoptotische Zellen. Aktin ist mit Phalloidin rot gefärbt und die Kerne sind blau (Toto 3).

**C:** Einzelner apoptotischer Myozyt (Farben wie B)

**D:** Einige positive Myozyten (Farben wie B)

## 5. Immunhistochemie

Mit Hilfe der Immunhistochemie wurde die Anwesenheit und die Verteilung von fünf verschiedenen Proteinen untersucht. Dazu wurden die Gefrierschnitte nach dem Protokoll unter Kapitel III Punkt 5.2.3. mit den jeweiligen Antikörpern (Tab. 2) markiert und mit dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet.

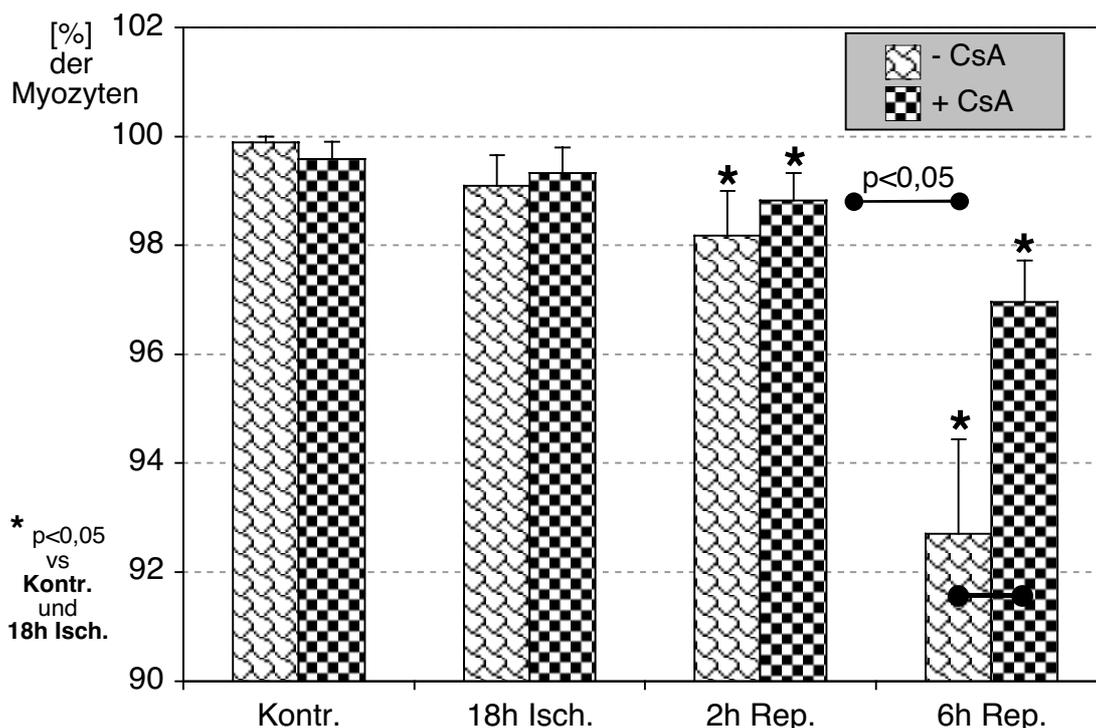


Abb. 14: Die dargestellten Mittelwerte ( $\pm$  SEM) des prozentualen **Anteils** an **Lamin B1 positiven Kernen** fallen in beiden Gruppen während der Reperfusion signifikant ab. Weiterhin besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen nach sechs Stunden Reperfusion.

## 5.1. Lamine

Bei den Laminen handelt es sich um Proteine der inneren Kernmembran, die während der Apoptose vollständig abgebaut werden. Sie lassen sich in der Immunhistochemie, je nach Anschnitt des Kerns, entweder als fluoreszierenden Ring um den Kern oder auch komplett über die gesamte Kernfläche verteilt darstellen. Da die Lamine in einen A- und einen B-Typ unterteilt werden, wurden in der durchgeführten Studie Lamin B1 und Lamin A einzeln markiert und entsprechend der Beschreibung unter Kapitel III Punkt 5.2.4. quantifiziert.

### 5.1.1. Lamin B1

In beiden Gruppen zeigten die Kontrollbiopsien eine sehr intensive grüne Fluoreszenz aller Kerne (Abb. 15A). Diese blieb während der Ischämie nahezu erhalten, verlor allerdings insgesamt etwas an Intensität (Abb. 15B). Während der Reperfusion folgte dann ein signifikanter Verlust von positiven Myozytenkernen (Abb. 15C). Hierbei verringerte sich die Rate von Lamin B1-positiven Kernen nach zwei Stunden von 100% auf 98% in den CsA freien Herzen und auf 99% in der mit CsA-behandelten Herzen. Auch beim Vergleich der Ergebnisse nach sechsstündiger Reperfusion wurde die protektive Wirkung des CsA deutlich. Unter dem Einfluss von CsA wurde das Lamin B1 nur in 3% der Myozytenkerne abgebaut, während

sich der Anteil an negativen Myozytenkerne in der unbehandelten Gruppe signifikant auf 7% erhöhte (Abb. 14). Auffällig dabei ist die hohe Korrelation zwischen den Ergebnissen der TUNEL-Methode und der Lamin B1-Färbung. Dabei ist die Rate der TUNEL-positiven Kerne fast identisch mit dem Anteil der Lamin B1-negativen Kerne. Dies deutet mit einer hohen Wahrscheinlichkeit daraufhin, dass es sich bei den TUNEL-positiven Zellen um apoptotische Prozesse handelt.

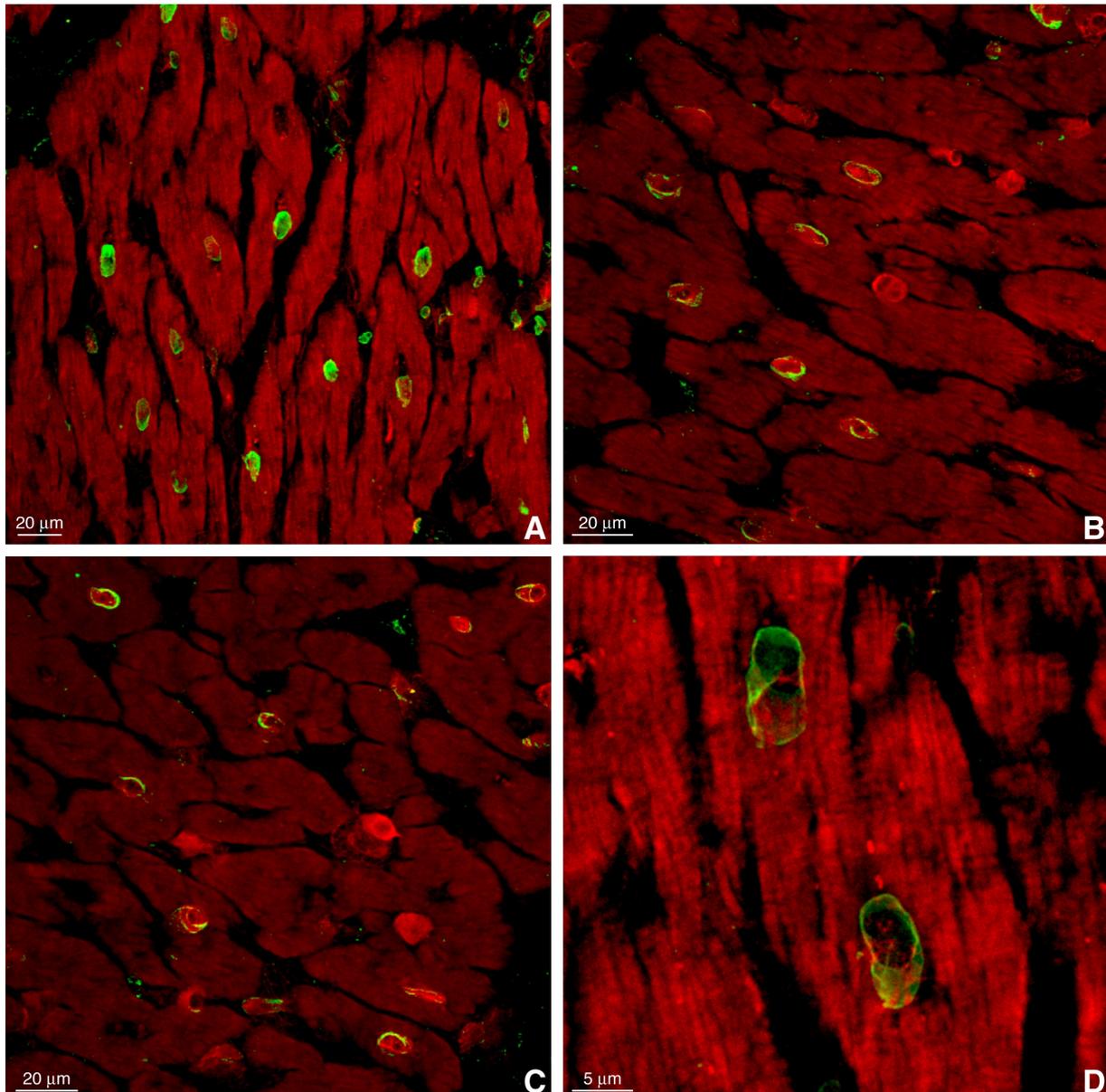


Abb. 15: Konfokale Bilder von Lamin B1 (grün). Aktin ist mit Phalloidin rot markiert und die Kerne sind dunkelrot (Propidium-Iodid).

- A:** In der Kontrolle zeigen alle Kerne eine intensive Markierung von Lamin B1  
**B:** Nach der Ischämie ist die Markierung weniger intensiv und einige Kerne im Interstitium sind negativ.  
**C:** Positive und negative Kerne.  
**D:** Vergrößerung von zwei positiven Myozyten.

### 5.1.2. Lamin A

Entsprechend der Lamin B1-Resultate zeigten nahezu alle Kerne in den Kontrollbiopsien eine positive grüne Markierung (Abb. 17A). Aber schon während der Ischämie kam es in der unbehandelten Gruppe zu einem Verlust an positiven Myozytenkernen von 98,9% auf 94,5% (Abb. 16). Dieser gipfelte nach sechsständiger Reperfusion in einer signifikanten Verringerung auf 72,8% der Myozyten (Abb. 16). Zu einem deutlich geringeren Abbau von Lamin A führte die Perfusion der isolierten Herzen mit CsA. Bei diesen Herzen blieb die Gesamtzahl an positiven Kernen während der Ischämie konstant und fiel erst im Laufe der Reperfusion um 5% auf 95,3% ab (Abb. 16). Zusammenfassend unterstützen die immunhistochemischen Quantifizierungen von Lamin B1 und A die mit der TUNEL-Methode ermittelten Ergebnisse. In beiden Fällen wurde der im Verlauf der Apoptose stattfindende Abbau von Laminen durch den Einsatz von CsA signifikant verringert.

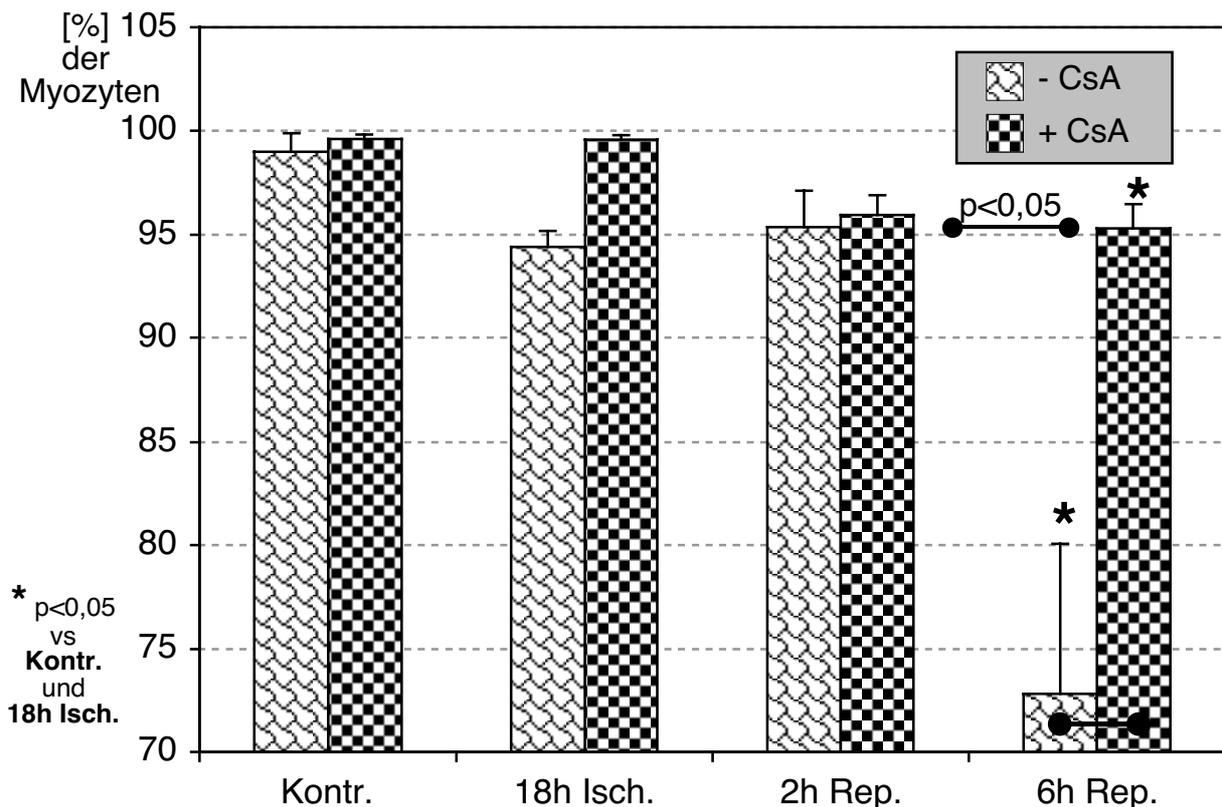
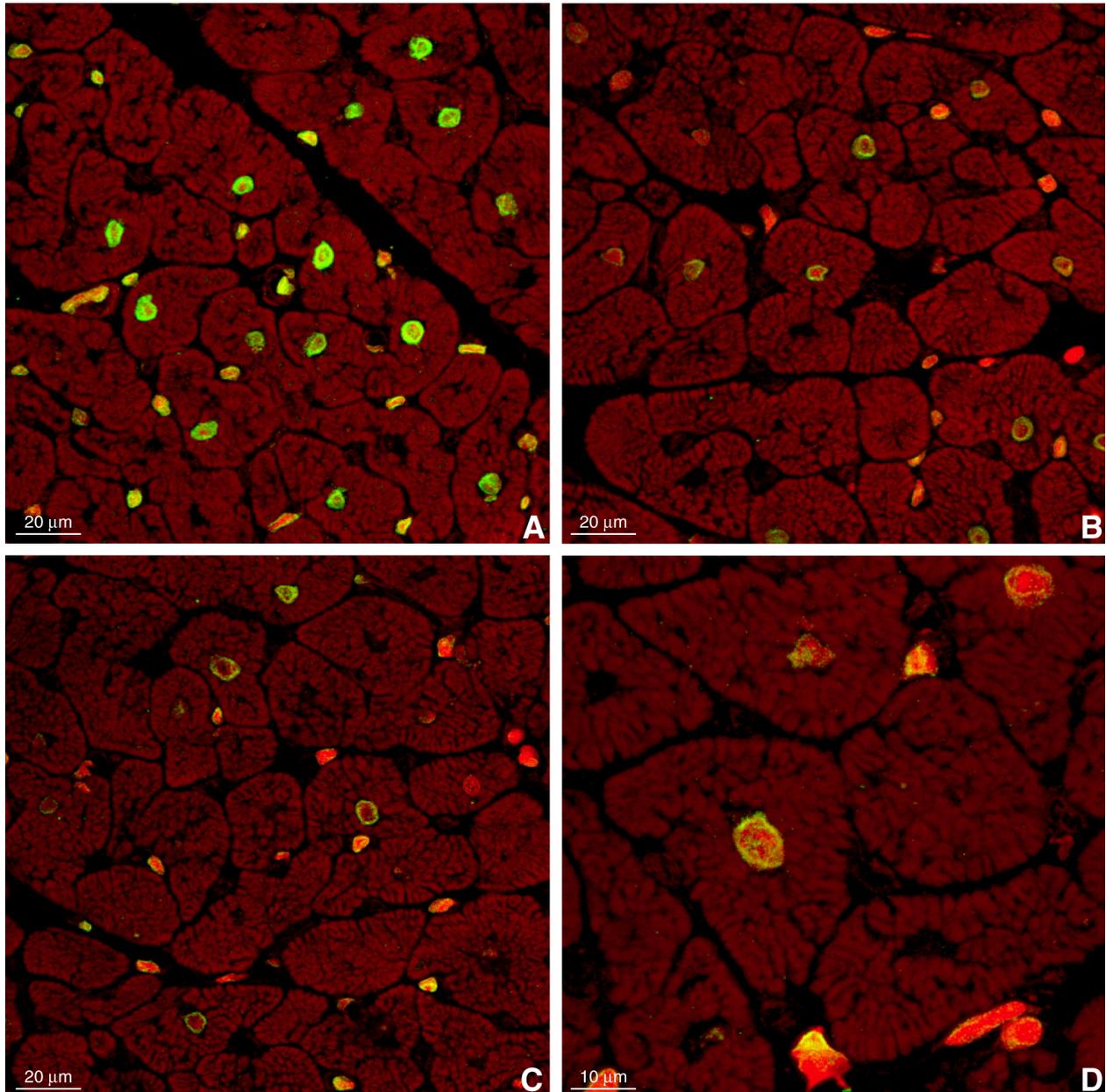


Abb. 16: Die prozentualen Mittelwerte ( $\pm$  SEM) an **Lamin A positiven Myozytenkernen** zeigen in beiden Gruppen eine signifikante Verringerung in der nach 6ständiger Reperfusion entnommenen Biopsie, wobei ein deutlicher Unterschied zwischen der CsA-behandelten und unbehandelten Gruppe besteht.



*Abb. 17: Konfokale Bilder von Lamin A (grün). Aktin ist mit Phalloidin rot markiert und die Kerne sind dunkelrot (Propidium-Iodid).*

*A: Alle Kerne der Kontrollbiopsie zeigen eine intensiv positive Markierung.*

*B: Am Ende der Ischämie sind einzelne Myozytenkerne und ein Großteil der Kerne im Interstitium negativ. Insgesamt erscheint die Markierung weniger intensiv.*

*C: Am Ende der Reperfusion ist die Anzahl negativer Myozyten deutlich erhöht.*

*D: Vergrößerung von zwei positiven Myozyten.*

## 5.2. Sarkomere Proteine

### 5.2.1. Alpha-Aktinin

Alpha-Aktinin gehört nach der Einteilung von Kostin et al.<sup>111</sup> zu den sarkomeren Gerüstproteinen und ist in den Z-Streifen (Zwischenscheibe) der Sarkomeren lokalisiert. Bei der Fluoreszenz-Markierung stellt es sich aufgrund der parallelen Anordnung der Myofibrillen als deutliche Querstreifung dar und kann bezüglich der Intensität sowie der Regelmäßigkeit beurteilt werden. In den gefärbten Präparaten zeigten die Kontrollbiopsien alle eine intakte, gleichmäßige Querstreifung (Abb. 18A). Diese blieb auch während der Ischämie erhalten, wobei eine, im Vergleich zu den Kontrollschnitten, auffällige Intensitätssteigerung in beiden Gruppen beobachtet wurde (Abb. 18B). Dabei war offensichtlich, dass sämtliche nach der Ischämie entnommenen Biopsien mit der gleichen, sehr starken Intensität leuchteten. Die in den Kontrollen vorliegenden leichten Schwankungen der Fluoreszenz-Intensität waren nicht mehr erkennbar. Erst in der Reperfusionphase kam es zu Auflösungserscheinungen der regelmäßigen Querstreifung (Abb. 18C-D). Insbesondere die Präparate der ersten Reperfusionbiopsie (C) zeigten verschiedene, über den Schnitt verteilte Areale, in denen die gleichmäßige Querstreifung unterbrochen oder durch diffuse alpha-Aktininmarkierung ersetzt war. Des Weiteren wiesen alle Biopsien dieses Zeitpunktes deutliche Intensitätsschwankungen der Fluoreszenz-Markierung auf. Trotz dieser teilweise gravierenden Veränderungen war die Querstreifung in den Schnitten weitestgehend gut erhalten. Beim Vergleich der Präparate fanden sich zwar graduelle Unterschiede zwischen den einzelnen Hunden, allerdings konnte kein deutlicher Unterschied zwischen den behandelten und nicht behandelten Tieren festgestellt werden. Auch bei den vier Stunden später genommenen D-Biopsien konnten die beschriebenen Veränderungen beobachtet werden, wobei sich der Grad der Veränderungen in den Biopsien nach 6stündiger Reperfusion deutlich verbessert hatte. Die Schnitte zeigten im Vergleich zu den jeweiligen C-Biopsien weniger Areale mit aufgelöster Querstreifung und insgesamt nicht so große Intensitätsschwankungen. Wie zu den früheren Zeitpunkten konnte auch zum Ende der Reperfusion keine Unterscheidung zwischen den zwei Versuchsgruppen gemacht werden. Zur Verdeutlichung sind die Querstreifung und die Veränderungen auf den Abbildungen 18A bis 18D als konfokale Bilder dargestellt.

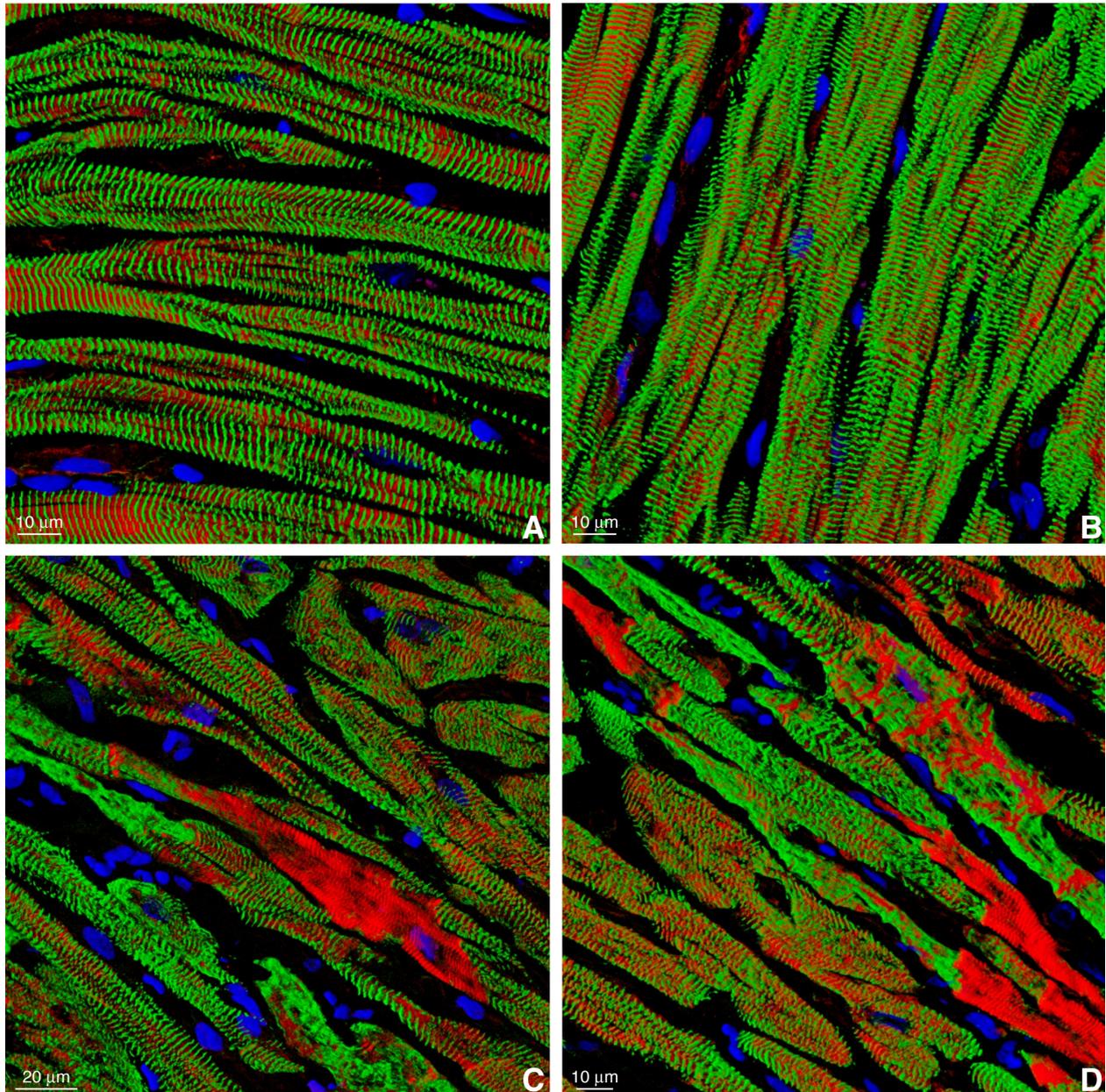


Abb. 18: Konfokale Bilder von alpha-Aktinin (grün). Aktin ist mit Phalloidin rot gefärbt und die Kerne sind blau (Toto 3).

**A:** Kontrollbiopsie. Die Myozyten zeigen eine intakte, gleichmäßige Querstreifung.

**B:** Ende der Ischämie. Die Querstreifung bleibt erhalten und leuchtet mit einer sehr starken Intensität.

**C:** Reperfusion. Die gleichmäßige Querstreifung wird durch deutliche Auflösungserscheinungen in einzelnen Myozyten unterbrochen.

**D:** Reperfusion. Verschiedene über den Schnitt verteilte Areale zeigen eine diffuse oder aufgelöste alpha-Aktininmarkierung.

### **5.2.2. Aktin**

Da die, unter Punkt 5.2.1. beurteilten, Präparate mit TRITC-Phalloidin doppelmarkiert waren, wurden sie in einem weiteren Arbeitsschritt mit einem speziellen Rotfilter untersucht. Dabei stellte sich die Aktin-Färbung entsprechend der alpha-Aktininmarkierung als ein regelmäßiges rotes Querstreifenmuster dar. Diese alternierende Querstreifung war in allen Präparaten gleich und zeigte auch während der Reperfusionphase keine Veränderungen. Dementsprechend wurde auf eine separate Markierung von Aktin verzichtet.

### **5.3. Complement C9**

Complement C9 (CC9) als wichtiger Faktor der Komplement-Gerinnungskaskade, eignet sich in Ischämie-Reperfusionmodellen vorzüglich zum Nachweis der Nekrose. Das im Blut zirkulierende Complement C9 dringt dabei während der Reperfusion in die nekrotischen Myozyten ein und lagert sich dort ab. Anschließend kann man diese Zellen anhand des, unter Kapitel III Punkt 5.2.3. beschriebenen, Protokolls markieren und im Fluoreszenz-Mikroskop nachweisen. Dabei zeigen nekrotische Zellen eine gleichmäßige grüne Fluoreszenz, während die intakten Herzmuskelzellen nur die mit Phalloidin rot gefärbte Aktinmarkierung aufweisen. Des weiteren werden alle Gefäße markiert, da die Endothel-Zellen sehr sensibel auf die während der Ischämie herrschende Hypoxie reagieren. Das Vorhandensein dieser Markierungen wurde in der Studie als Positivkontrolle genutzt. Um Spezies-spezifische Unterschiede zwischen den Antikörpern und den darzustellenden Proteinen auszuschließen, wurden die Schnitte mit verschiedenen mono- und polyklonalen Complement C9-Antikörpern behandelt.

Bei der Beurteilung der Präparate wiesen die A- und B-Biopsien erwartungsgemäß keine Markierung auf. Und auch in den, während der Reperfusion entnommenen, C- und D-Biopsien wurden keine positiven Herzmuskelzellen gefunden. Allerdings waren die Gefäße in diesen Schnitten grün gefärbt. Dies entspricht den Ergebnissen der elektronenmikroskopischen Untersuchung und zeigt deutlich, dass es in diesem Modell nicht zur Nekrose der Myozyten kommt.

## **6. Western Blot**

Nach der Auftrennung und dem Transfer auf Nitrozellulosemembranen wurden verschiedene Proteine immunologisch dargestellt und quantitativ ausgewertet.

## 6.1. Sarkomere Proteine

### 6.1.1. Alpha-Aktinin

Zur Klärung, ob es sich bei den unter Punkt 5.2.1. beobachteten Veränderungen um Abbauvorgänge des Sarkomers oder des alpha-Aktinin-Moleküls handelt, wurde die Gesamtmenge an Herzmuskel-spezifischem alpha-Aktinin in den Biopsien untersucht. Dabei stellte sich die Western Blot-Analyse mit dem monoklonalen alpha-Aktinin-Antikörper als eine Folge gleichmäßiger Banden dar (Abb. 19). Auch der Vergleich zwischen den beiden Versuchsgruppen ergab keine Unterschiede. Demzufolge wurde zu Anfang der Reperfusion zwar die Sarkomer-Struktur in Teilbereichen der Herzmuskelzellen verändert, aber es kam nicht zum Abbau der eigentlichen alpha-Aktinin-Molekülen.

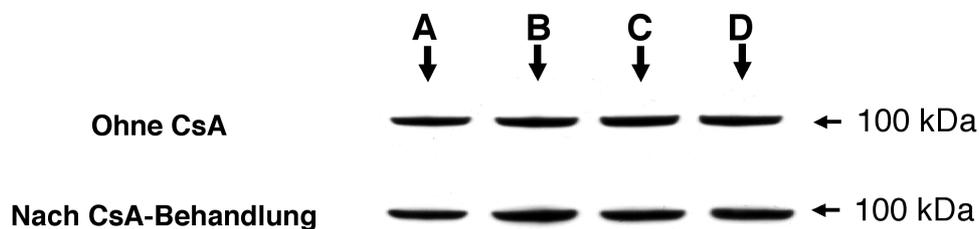


Abb. 19: Darstellung der gleichmäßigen alpha-Aktinin-Banden zu den verschiedenen Biopsiezeitpunkten.

**A** = Kontrolle, **B** = 18h Ischämie, **C** = 2h Reperfusion, **D** = 6h Reperfusion

### 6.1.2. Aktin

Im Gegensatz zu alpha-Aktinin gehört Aktin nach der Einteilung von Kostin et al.<sup>111</sup> zu den kontraktilen Proteinen der Herzmuskelzelle. Es ist in der I-Bande der Sarkomere lokalisiert und führt in Verbindung mit dem Myosin zu den Kontraktionen der Herzmuskelzelle. Im Western Blot lässt es sich mit dem monoklonalen Antikörper (Dako) als deutliche Bande bei 43 kDa darstellen. Die Analyse zeigte bei den CsA-freien Herzen keinerlei Unterschiede zwischen den Banden der verschiedenen Biopsien (Abb. 20). Und auch bei den mit CsA perfundierten Tieren blieb die Gesamtmenge an Aktin während des gesamten Versuchs gleich.

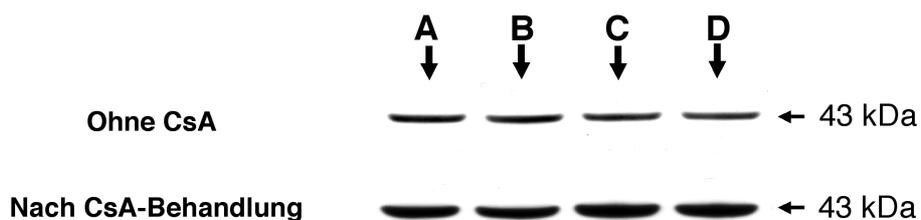


Abb. 20: Die Abbildung zeigt die gleichbleibende Gesamtmenge an Aktin in den vier Biopsien.

**A** = Kontrolle, **B** = 18h Ischämie, **C** = 2h Reperfusion, **D** = 6h Reperfusion

## 6.2. Calcineurin

Der Gesamtgehalt von Calcineurin wurde in der zytosolischen Fraktion bestimmt. Dazu wurde die optische Dichte der dargestellten Bande gemessen und anschließend die Relation zur auf 100% gesetzten Kontrolle berechnet. Hierbei wurde gezeigt, dass der Gehalt an Calcineurin in beiden Gruppen während der Ischämie und den ersten zwei Stunden der Reperfusion nur leicht sank. Erst nach 6stündiger Reperfusion fiel die Gesamtmenge an Calcineurin signifikant auf 64% ohne Zusatz von CsA und auf 72% nach der Perfusion mit CsA (Abb. 21+22). Allerdings konnten zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

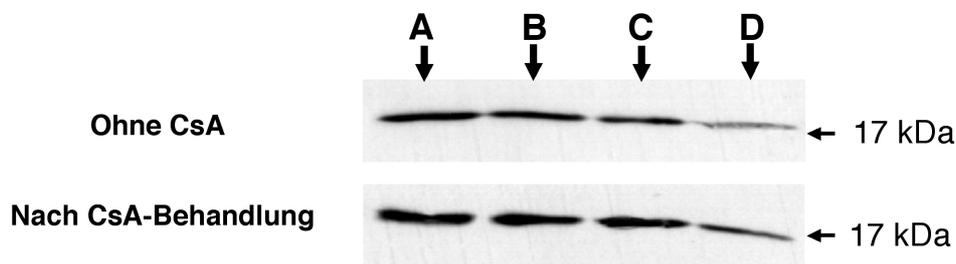


Abb. 21: Western Blot mit dem monoklonalen Calcineurin-Antikörper  
**A** = Kontrolle, **B** = 18h Ischämie, **C** = 2h Reperfusion, **D** = 6h Reperfusion

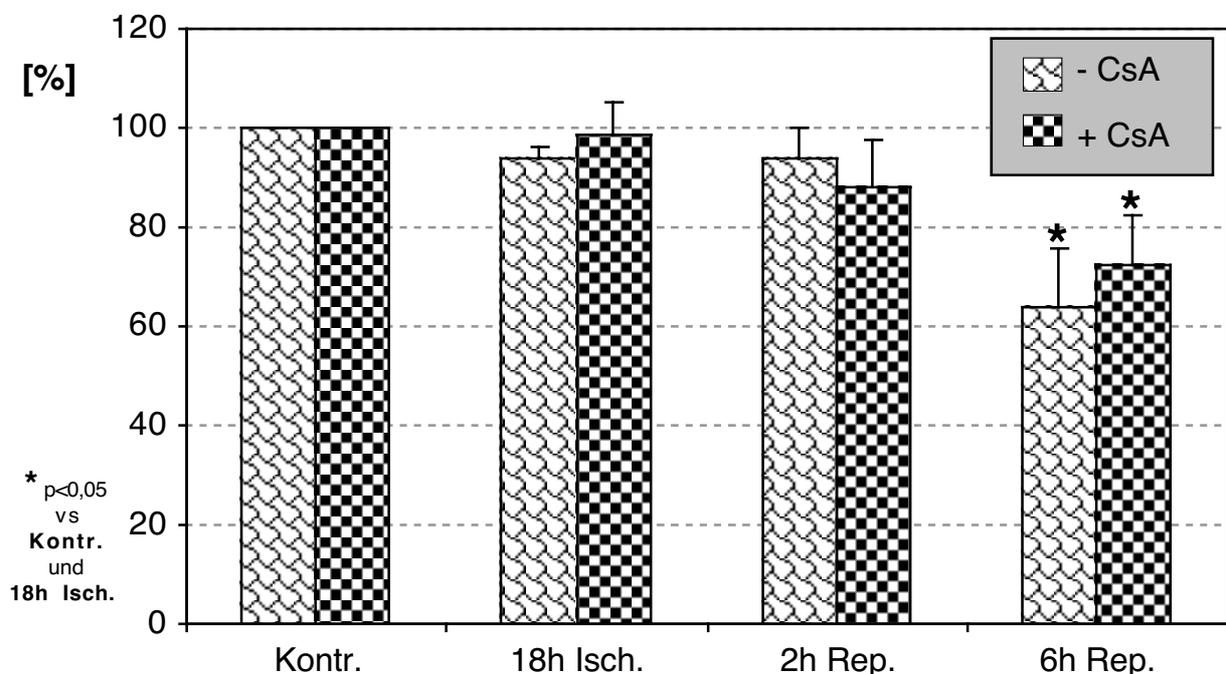


Abb. 22: Die prozentuale **Gesamtmenge an Calcineurin** wird als Mittelwert ( $\pm$  SEM) im Verhältnis zur Kontrolle dargestellt und zeigt nur nach sechs Stunden Reperfusion signifikante Unterschiede.

### 6.3. Apoptose-relevante Proteine

#### 6.3.1. Cytochrom C

Normalerweise befindet sich das Cytochrom C in den Mitochondrien der Herzmuskelzellen. Erst im Verlauf der Ischämie kommt es zu einer Öffnung der mitochondrialen Poren und zu einem eventuellen Austritt des Cytochroms in das Zytosol. Dort kann es durch eine Aktivierung der Caspasenkaskade zur Apoptose der Zelle führen. Mit Hilfe des Western Blots kann man die Verteilung des Cytochroms in den einzelnen Fraktionen nachweisen und feststellen, ob es in diesem Modell zum Austritt des Cytochrom C's aus den Mitochondrien kommt.

##### 6.3.1.1. Partikuläre Fraktion

Bezüglich des Gehaltes an Cytochrom C in der particulären Fraktion der CsA-freien Gruppe fand sich ein signifikanter Abfall nach 18stündiger Ischämie (Abb. 23 und 25). Die Gesamtmenge fiel von 100% in der Kontrolle auf 48% zum Ende der Ischämie. Einen ähnlichen Verlauf zeigte die mit CsA behandelte Gruppe. Allerdings verringerte sich die Menge an Cytochrom C in diesen Herzen signifikant um ungefähr 30% von 100% auf 72,6% (Abb. 23 und 25). Dieser mittels CsA um 50% verringerte Verlust erwies sich bei der Überprüfung als signifikant.

Da man zur Interpretation der Ergebnisse wissen muss, ob alle Proben gleich viel Herzmuskelgewebe enthalten, wurden die Membranen im Anschluss an die Quantifikation „gestrippt“ und mit dem Herzmuskel-spezifischen alpha-Aktinin-Antikörper (Klon: EA-63) inkubiert. Die Abbildung 24 verdeutlicht, dass es kaum Unterschiede zwischen den Kontroll- und Ischämiebiopsien der einzelnen Hunde gibt.

Folglich muss es sich bei den dargestellten signifikanten Unterschieden, um Veränderungen im Cytochrom C-Gehalt der Herzmuskelmitochondrien handeln.

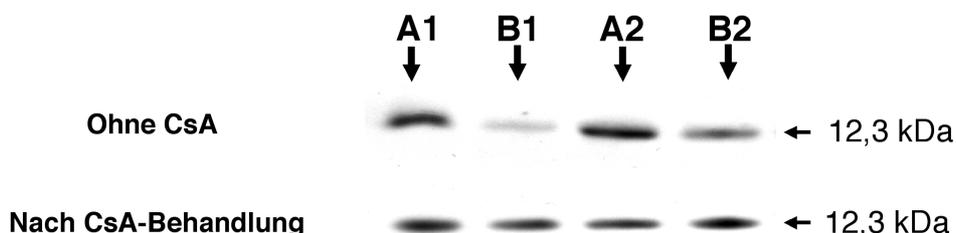


Abb. 23: Die Abbildung zeigt die Cytochrom C-Banden des monoklonalen Upstate-Antikörpers in jeweils zwei unbehandelten und behandelten Hunden.

**A1** = Kontrolle 1, **B1** = 18h Ischämie 1; **A2** = Kontrolle 2, **B2** = 18h Ischämie 2

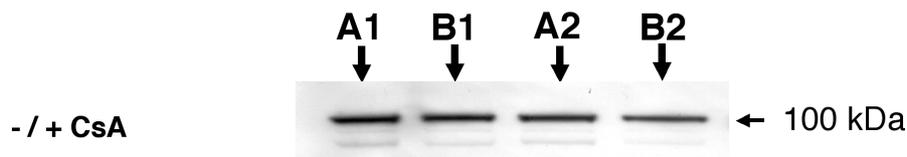


Abb. 24: Die dargestellten Banden verdeutlichen die gleichmäßige Verteilung des alpha-Aktinin in den unterschiedlichen Biopsien.

**A1** = Kontrolle (- CsA); **B1** = 18h Ischämie (- CsA)

**A2** = Kontrolle (+ CsA); **B2** = 18h Ischämie (+ CsA)

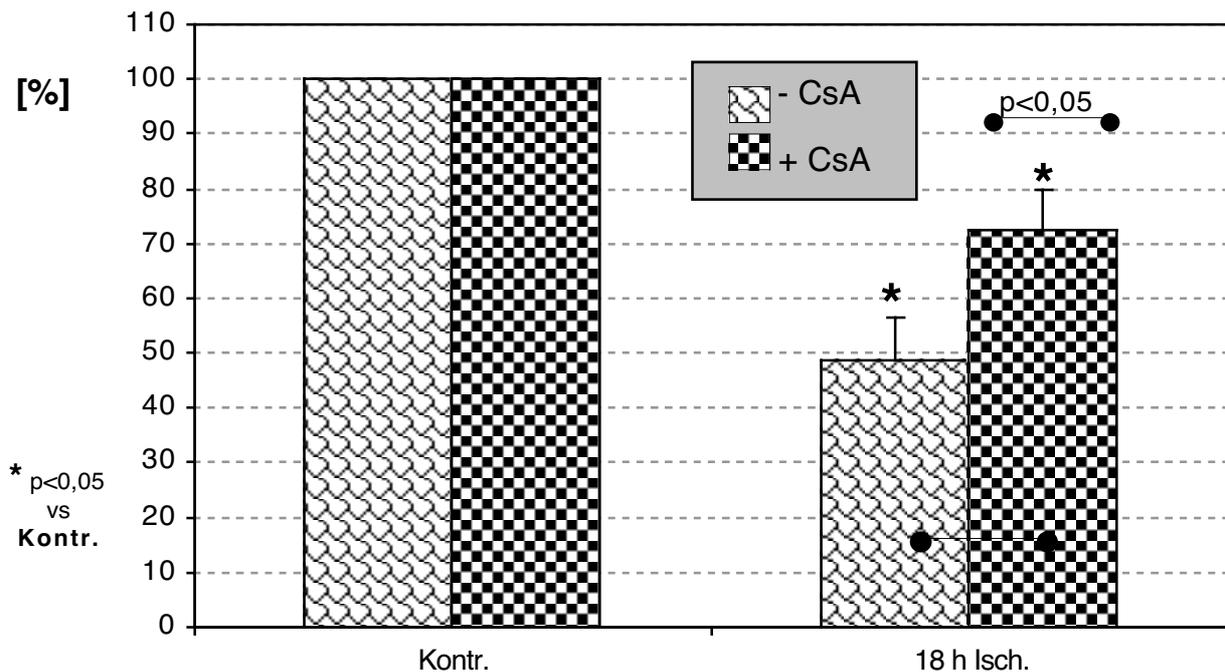


Abb. 25: Der Graph präsentiert die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der prozentualen **partikulären Cytochrom C-Gesamtmenge** sowie die signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Gruppen.

### 6.3.1.2. Zytoplasmische Fraktion

Während es in der partikulären Fraktion zum Ende der Ischämie zu einer Verringerung des Cytochrom C-Gehaltes kam, erhöhte sich die Menge an Cytochrom-C in der zytoplasmischen Fraktion. In der Abbildung 26 sind die, mit dem polyklonalen Santa-Cruz-Antikörper markierten, Cytochrom C-Banden in der zytoplasmischen Fraktion dargestellt. Dabei ist die intensivere Bande der Ischämiebiopsie in beiden Gruppen offensichtlich. Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen der partikulären Fraktion und zeigt, dass das Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytosol der Zelle übergeht. Auf eine quantitative Auswertung wurde verzichtet, da in der Kontrolle nahezu kein Cytochrom C nachweisbar war.



Abb. 26: Mit polyklonalem Cytochrom C-Antikörper durchgeführte Western Blot-Analyse der zytosolischen Fraktion.

**A1** = Kontrolle (– CsA); **B1** = 18h Ischämie (– CsA)

**A2** = Kontrolle (+ CsA); **B2** = 18h Ischämie (+ CsA)

### 6.3.1.3. Gemischte Fraktion

Zuletzt wurde der Gesamtgehalt von Cytochrom C in der gemischten Fraktion festgestellt. Hierbei ergab sich eine gleichmäßige Verteilung der Banden in allen untersuchten Biopsien (Abb. 27). Dies beweist, dass die Gesamtmenge an Cytochrom C während der Ischämie erhalten bleibt und es nur zu einer Umverteilung innerhalb der Zelle kommt.

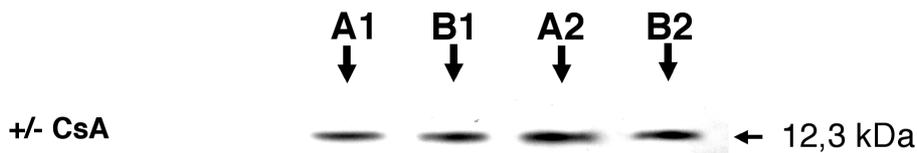


Abb. 27: Cytochrom C-Nachweis in der gemischten Fraktion mittels Western-Blot-Analyse.

**A1** = Kontrolle (– CsA); **B1** = 18h Ischämie (– CsA)

**A2** = Kontrolle (+ CsA); **B2** = 18h Ischämie (+ CsA)

### 6.3.2. Bax

Bax stellt ein pro-apoptisches Mitglied der Bcl 2-Familie dar, welches mittels Western Blot-Analyse in der gemischten Fraktion nachgewiesen werden kann. Dazu wurden die Membranen mit einem monoklonalen Bax-Antikörper inkubiert und nach der Entwicklung quantifiziert (siehe Kapitel III Punkt 7). Dabei zeigte sich während der Ischämie ein minimaler Anstieg der Bax-Gesamtmenge von jeweils 100% auf 104,6% ohne CsA und auf 101,7% mit CsA. In der darauf folgenden Reperfusion wurde das Bax wieder abgebaut und lag zum Ende der Reperfusion signifikant unter den Kontrollwerten. Hierbei ergab sich für die CsA-freien Herzen einen Wert von 64,6% und bei den behandelten Tieren einen Wert von 71,3% (Abb. 28-29). Vergleichend traten zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 29).

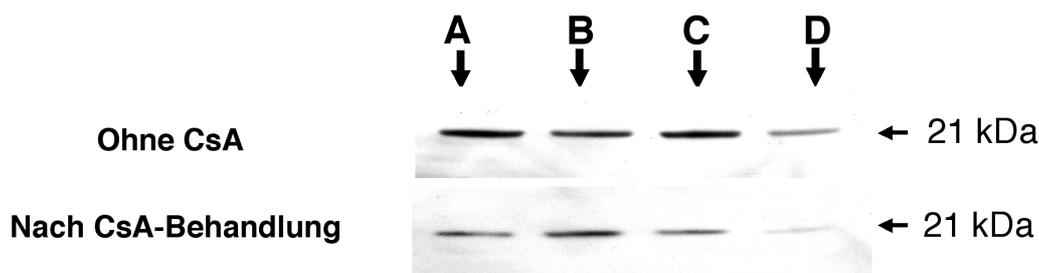


Abb. 28: Darstellung der Bax-Banden mittels Western Blot-Analyse. **A** = Kontrolle, **B** = 18h Ischämie, **C** = 2h Reperfusion, **D** = 6h Reperfusion

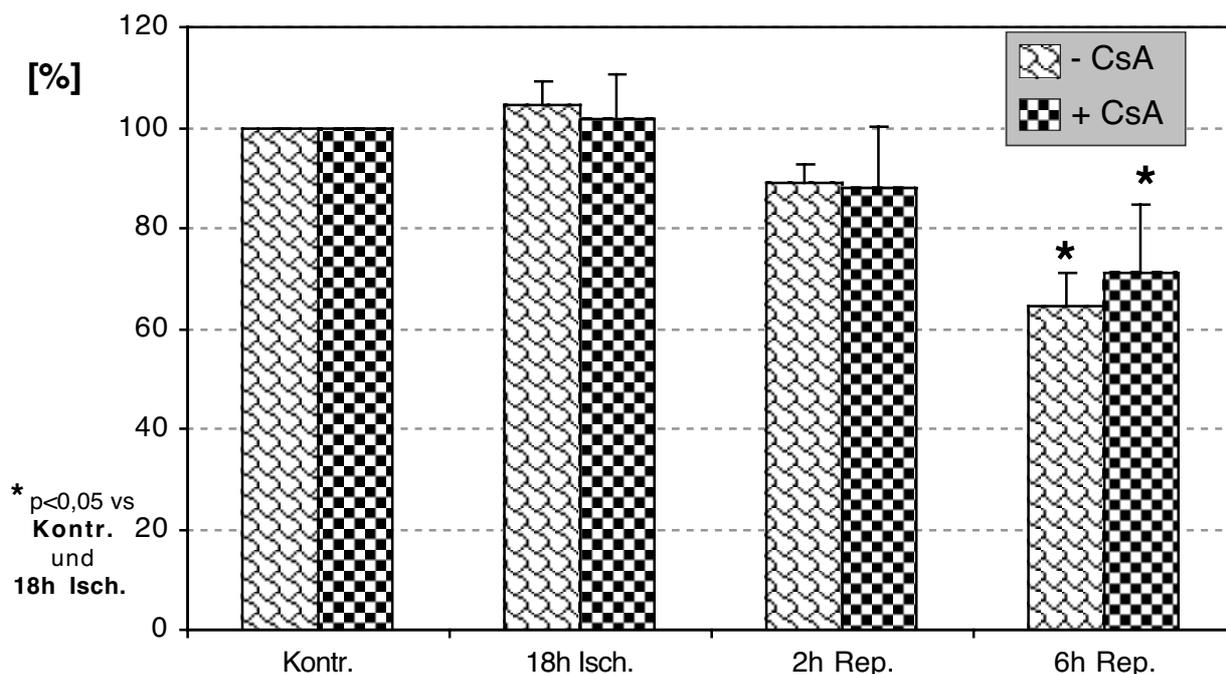


Abb. 29: Die graphische Darstellung verdeutlicht die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der **Gesamtmenge an Bax** und den signifikanten Abfall nach 6stündiger Reperfusion in beiden Gruppen.

### 6.3.3. Bcl-2

Das, als Gegenspieler von Bax bekannte, anti-apoptotische Bcl-2 befindet sich an den äußeren Membranen der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums. Nach der Auftrennung der gemischten Fraktion lässt es sich mit einem spezifischen Antikörper darstellen und quantitativ auswerten. Dabei wurde ein Anstieg der Gesamtmenge an Bcl-2 während der Ischämie von 100% auf 111% in den unbehandelten und auf 123% in den CsA-behandelten Herzen offensichtlich (Abb. 30-31). Auch in den ersten zwei Stunden der Reperfusion lagen die Mittelwerte deutlich über den zu Anfang des Versuchs gemessenen Kontrollwerten (-CsA: 115%, +CsA: 115%). Dies änderte sich erst in der zum Ende der 6stündigen Reperfusion genommenen Biopptaten. Bis zu diesem Zeitpunkt führte ein starker Abbau zu einer signifikanten Verringerung der Gesamtmenge an Bcl-2, wobei sich

die Werte ohne CsA auf 69,9% und mit CsA auf 81% einpendelten (Abb. 30+31). Die, beim Vergleich der beiden Gruppen, gefundenen geringen Unterschiede erwiesen sich als nicht signifikant.

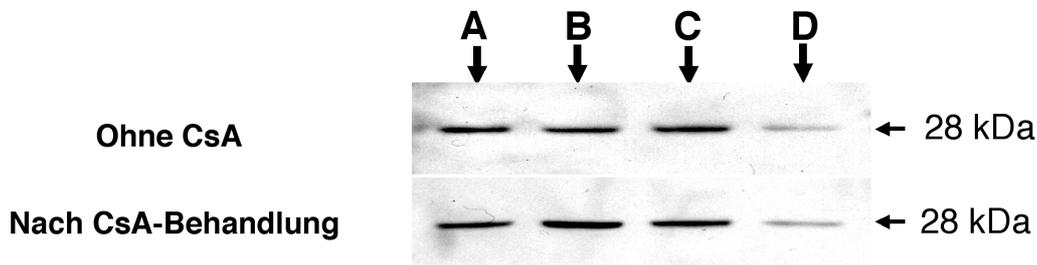


Abb. 30: Immunologische Darstellung der Bcl-2-Banden in den Biopsien zweier Hunde. **A** = Kontrolle, **B** = 18h Ischämie, **C** = 2h Reperfusion, **D** = 6h Reperfusion

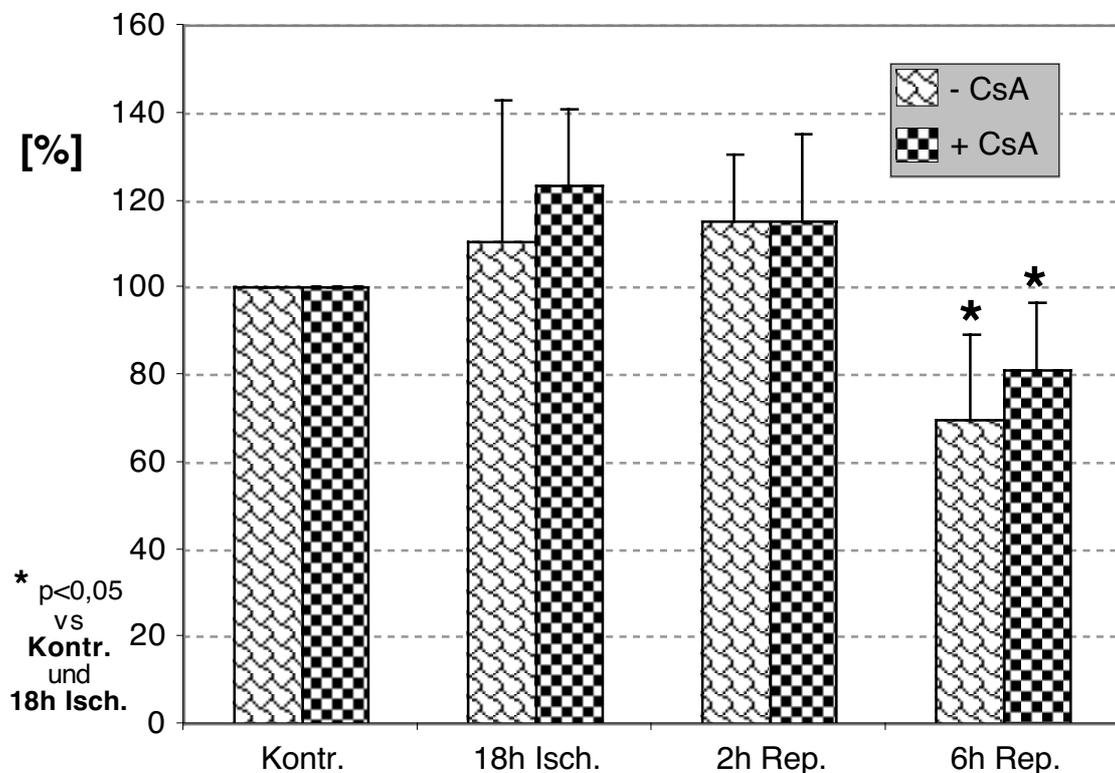


Abb. 31: Die Abbildung verdeutlicht die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der prozentualen Gesamtmenge an Bcl-2 in der gemischten Fraktion.

## 7. Calcineurinaktivität

Da CsA in der Literatur als sehr spezifischer und wirkungsvoller Inhibitor von Calcineurin bekannt ist, wurde in dieser Studie die Calcineurinaktivität mit Hilfe von radioaktiv-markiertem Myelin-Basic-Protein bestimmt (siehe Kapitel III Punkt 8). Wie die Abbildung 32 zeigt, führte die Perfusion der Herzen mit CsA zu einer vollständigen Blockade der Calcineurinaktivität. Im Gegensatz dazu kam es

in den unbehandelten Herzen nach 18stündiger Ischämie nur zu einem 7%igen Aktivitätsverlust. Dieser vergrößerte sich in der nachfolgenden 6stündigen Reperfusion auf 30% der Ausgangsaktivität.

Aus der im Western Blot bestimmten Gesamtmenge an Calcineurin folgt, dass es sich bei dem kompletten Verlust der Aktivität in der behandelten Gruppe nicht um einen vollständigen Abbau des Proteins handeln kann.

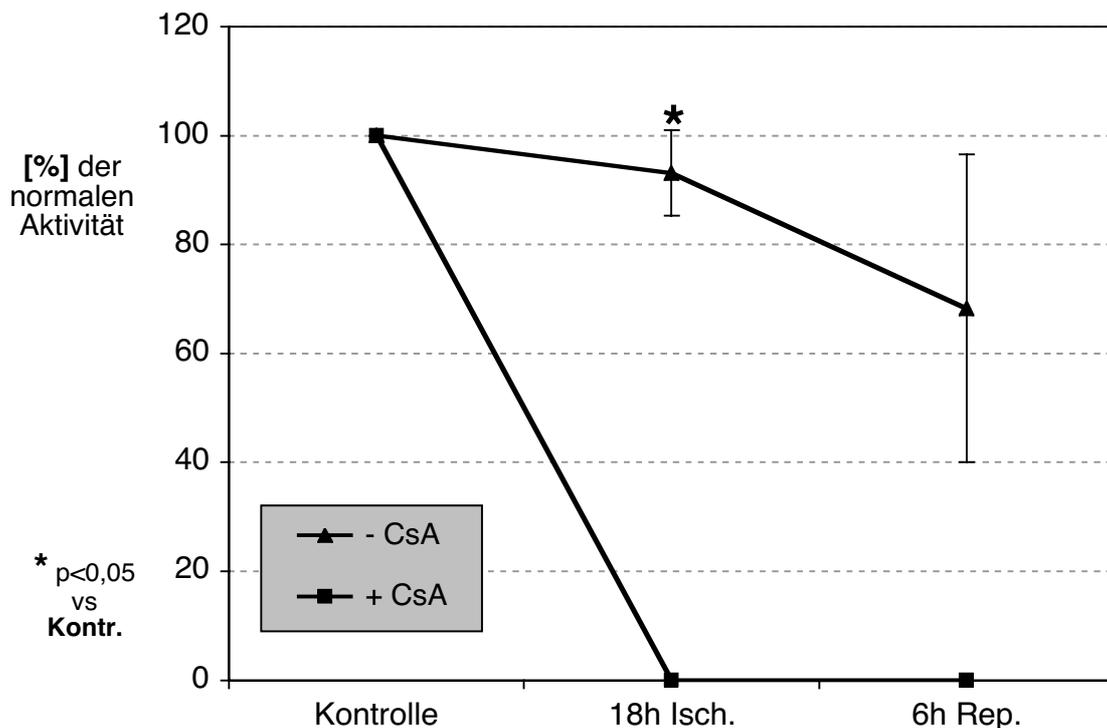


Abb. 32: Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der gemessenen Calcineurinaktivität.

## 8. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung von Cyclosporin A auf Hundeherzgewebe in einem globalen Langzeitischämie-Modell untersucht werden. Hierzu wurden die entnommenen Hundeherzen 18 Stunden in University-of-Wisconsin-Lösung aufbewahrt und anschließend an ein Empfängertier angeschlossen. Danach folgte eine 6stündige Reperfusion. Dabei unterschieden sich die zwei, jeweils aus sechs Herzen bestehenden Versuchsgruppen durch den Zusatz von Cyclosporin A zur UW-Lösung.

- Schon während des Versuchs wurde der protektive Effekt von Cyclosporin A offensichtlich. Während sich die kontraktile Funktion der unbehandelten Herzen nur zu 50% erholte, zeigte die Funktionsmessung in der mit CsA behandelten Gruppe eine vollständige funktionelle Erholung.

Im weiteren Verlauf der Studie sollten die möglichen Ursachen für diese Protektion des Herzgewebes anhand histologischer Methoden geklärt werden. Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse:

- Der Gehalt an ATP fiel in den Herzen beider Gruppen während der Ischämie deutlich ab und erholte sich im Verlauf der Reperfusion nicht.
- Bei der Beurteilung des Schädigungsgrades ergaben sich weitaus gravierendere Veränderungen in den am Ende der Ischämie entnommenen Biopsien der Kontrollgruppe.
- In keinem der elektronenmikroskopisch untersuchten Präparate wurden nekrotische Zellen gefunden. Dies wurde durch die fehlende Complement C9-Markierung bestätigt.
- Unter dem Einfluss von CsA wurde die Apoptoserate nach 6 Stunden Reperfusion signifikant auf 2,4% im Vergleich zu 5,9% (ohne CsA) gesenkt.
- Diese Reduzierung der Apoptose wurde durch die Ergebnisse der Lamin B1 Färbung gestützt. Hierbei fiel die Zahl der Lamin B1-positiven Kerne in der D-Biopsie der CsA-Gruppe auf 97% und in der CsA-freien Gruppe auf 93%. Ähnliches galt für den Verlust der Lamin A-positiven Kerne nach 6stündiger Reperfusion. Dieser betrug 5% in den behandelten Tieren im Vergleich zu 27% in den Kontrolltieren.
- Bei der Quantifizierung der Western Blots ergaben sich einige signifikante Unterschiede. Während die Gesamtmenge an partikulärem Cytochrom C zum Ende der Ischämie in den CsA-Herzen auf 73% sank, kam es ohne Zufuhr von CsA zu einer signifikanten Verringerung dieses Anteils auf 48%. In den gleichen Tieren fiel der Gehalt an Bax in der gemischten Fraktion nach 6 Stunden Reperfusion auf 65% ohne und 71% mit CsA. Entsprechende Ergebnisse zeigte die Western Blot Analyse des Bcl-2's. Nach anfänglichem Anstieg auf 111% (ohne CsA) bzw. 123% (mit CsA) während der Ischämie fiel die Menge zum Ende der Reperfusion auf 70% bzw. 81%.
- Die Perfusion der Herzen mit CsA führte zu einer kompletten Blockade der Calcineurinaktivität während der Ischämie und der Reperfusion. Vergleichend dazu blieb die Aktivität in den unbehandelten Herzen im Verlauf der Ischämie erhalten. Sie betrug erst nach sechs Stunden Reperfusion 70% der Ausgangsaktivität. Bezüglich der Gesamtmenge an Calcineurin fand sich ein Abfall von 100% auf 64% (ohne CsA) bzw. auf 72% (mit CsA) nach 6stündiger Reperfusion.

- Die Gesamtmenge an alpha-Aktinin und Aktin blieb während des Versuchs konstant. Im Gegensatz dazu zeigte die immunhistochemische Markierung von alpha-Aktinin deutliche Veränderungen während der Reperfusion. Hierbei fanden sich in sämtlichen C- und D-Biopsien Areale mit aufgelöster oder diffuser Querstreifung, ohne dass graduelle Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gemacht werden konnten.

## V. DISKUSSION

### 1. Versuchsprotokoll

#### 1.1. Tiermodell

Für die Versuche bezüglich der protektiven Effekte von Cyclosporin A bei globaler Ischämie wurde ein *in vivo* Modell mit einem heterotop angeschlossenen Hundeherz verwendet. Dieses Modell stellt im Grunde eine arbeitende Langendorff-Präparation des Hundeherzens dar, wobei auf die normalerweise notwendige Sauerstoffanreicherung und die Wiederverwendung der zirkulierenden Flüssigkeit verzichtet werden kann<sup>112</sup>. Einen weiteren Vorteil bietet das frei zugängliche Spenderherz. Es ermöglicht eine genaue Erfassung der Funktionsparameter und verhindert Funktionsstörungen bei der Biopsieentnahme während der Reperfusion. Dabei haben sich die Messung des linksventrikulären Durchmessers und Druckes bei dynamisch abnehmender Vorlast als effiziente Methode zur Funktionsbestimmung erwiesen.

Da das Spenderherz an das Kreislaufsystem des Empfängertieres angeschlossen wurde, kann bei diesem Versuchsaufbau auf eine Herzlungenmaschine verzichtet werden.

Außerdem spielen die normalerweise bei Transfusionen vorkommenden immunologischen Reaktionen bei diesem Modell keine Rolle. Denn das Blutgruppensystem der Hunde besteht aus einer großen Anzahl verschiedener Blutgruppen, die nur nach mehrfacher Transfusion zu Transfusionszwischenfällen und immunbedingter Hämolyse führen.

Um die bei normothermer Ischämie auftretende letale Schädigung zu vermeiden, wurde die Ischämietoleranz des Gewebes mittels Kardioplegie und Hypothermie verbessert. Die Herzen wurden während der Ischämie mit kardioplegischer Lösung perfundiert und unter hypothermen Bedingungen aufbewahrt.

#### 1.2. Hypothermie

Schon 1950 konnten Bigelow et al.<sup>113</sup> die protektive Wirkung von Hypothermie während der kardialen Ischämie nachweisen. Wichtig dabei ist, dass die Hypothermie das gesamte Myokard betrifft, da Inhomogenitäten der Temperatur zu einer Reduzierung der Effekte führt. Diesbezüglich bestimmt immer der am schlechtesten gekühlte Anteil des Organs die Ischämietoleranz des

Gesamtorgans<sup>114</sup>. Ein weiteres Problem ergibt sich durch die spontane Aufwärmung des hypothermen Gewebes. Dieser exponentielle Anstieg führt zu einer Angleichung der Organtemperatur an die Umgebungstemperatur<sup>114</sup>.

Um bei den beschriebenen Versuchen eine möglichst schnelle und gleichmäßige Temperaturverteilung zu erreichen, wurden die Organe vor der Entnahme mit eiskalter kardioplegischer Lösung perfundiert. Anschließend wurden die Herzen in einer Kühlkammer bei 4°C unter konstanter Temperaturkontrolle aufbewahrt. Da bei dieser Versuchsanordnung keine Unterschiede zwischen der Organ- und der Umgebungstemperatur vorliegen, konnte die zu erwartende spontane Aufwärmung verhindert werden.

Ausschlaggebend für die geringere Schädigung des Gewebes ist die reduzierte Stoffwechselaktivität und der daraus resultierende verminderte Energieverbrauch der Zellen während der Hypothermie. Dies wurde durch den, von Buckberg et al.<sup>115</sup> gemessenen, Sauerstoffverbrauch ischämischer Herzen bestätigt. Während normotherm aufbewahrte Herzen nach dem eingeleiteten Herzstillstand 1,1 ml O<sub>2</sub>/100g/min verbrauchen, reduziert sich der Verbrauch auf 0,135 ml O<sub>2</sub>/100g/min bei 10°C. Einen zweiten Wirkungsmechanismus beschrieb Yamamoto<sup>116</sup> in einer aktuellen Publikation. Anhand seiner Versuche an isolierten Rattenherzen konnte er zeigen, dass temperatursensitive Ca<sup>2+</sup>-Kanäle für die verbesserte Ischämietoleranz verantwortlich sind.

Die Aufbewahrungstemperatur von 4°C für die Spenderherzen entsprach den Empfehlungen von Master et al.<sup>112</sup>. Nur bei dieser Temperatur erholte sich die Funktion nach vorangegangener 4-stündiger Ischämie innerhalb der 2-stündigen Reperfusionphase nahezu vollständig.

### **1.3. Kardioplegie**

Die Kardioplegie beschreibt den Zustand des akuten diastolischen Herzstillstandes bei gleichzeitig stark eingeschränktem Stoffwechsel. Dieser Zustand wird durch den Einsatz kardioplegischer Lösungen erreicht und führt zu einer Steigerung der Hypoxietoleranz des Gewebes. Die erste Empfehlung stammt von Melrose<sup>9</sup>, der im Jahre 1955 eine Lösung mit relativ hoher Kaliumkonzentration zur Einleitung der Kardioplegie beschrieb. Seitdem sind viele Untersuchungen auf dem Gebiet gemacht worden, die zur Entwicklung verschiedener kardioplegischer Lösungen geführt haben. Eine davon ist die in unserem Modell eingesetzte University of Wisconsin Lösung, deren Inhaltsstoffe in der Tabelle 16 aufgeführt werden.

Tab. 16: Zusammensetzung der University of Wisconsin Lösung

Inhaltsstoffe	Konzentration (mg/L)
Pentafraktion	50
KOH	5,61
NaOH	q.s.
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,4
Laktobiotische Säure	35,83
Raffinose	17,83
Allopurinol	0,14
Glutathion	0.92
Adenosin	1,34
Osmolarität	320 mOsM
Na <sup>+</sup> -Konzentration	29 mEq/L
K <sup>+</sup> -Konzentration	125 mEq/L
pH-Wert	7,4

Diese wurde ursprünglich für die Aufbewahrung von Pankreaten bei Pankreastransplantationen entwickelt <sup>14</sup>. Aber schon kurze Zeit später entdeckte man im Labor die Überlegenheit der UW-Lösung bei Leber- und Nierentransplantationen <sup>117,118</sup>, woraufhin sie nach einigen klinischen Tests als goldener Standard bei Lebertransplantationen eingeführt wurde. Im gleichen Zeitraum berichtete Swanson et al. <sup>15</sup> von den großen Vorteilen der UW-Lösung in Bezug auf Herztransplantationen. Im Vergleich mit anderen kardioplegischen Lösungen erholten sich die in UW-Lösung aufbewahrten Herzen nach 12stündiger Ischämie signifikant schneller und erreichten innerhalb von 60 Minuten ihre normale Herzfunktion.

Zu den protektiven Effekten der UW-Lösung gehört der direkt nach der Entnahme eingeleitete Herzstillstand des noch schlagenden Herzens. Dabei führt die hohe Kaliumkonzentration zu einer Depolarisation der Zellmembran und zu einer Hemmung der Myozytenkontraktion. Folglich wird der Verbrauch an ATP drastisch gesenkt und die Energiereserven werden geschont <sup>119</sup>.

Außerdem dient die auf 4°C gekühlte kardioplegische Lösung der raschen und gleichmäßigen Abkühlung des Organs, wodurch Temperaturinhomogenitäten weitestgehend vermieden werden.

Weitere Vorteile ergeben sich aus der besonderen Zusammensetzung der UW-Lösung. Einerseits verhindern die intrazellulären Konzentrationen von Na<sup>+</sup>- und

K<sup>+</sup>-Ionen den Einstrom von Na<sup>+</sup>-Ionen in die Zellen, andererseits vergrößern die impermeable Pentafraktion und das Laktobionat den extrazellulären onkotischen Druck. Beide Mechanismen hemmen die Schwellung der Myozyten und verhindern die Ausbildung intrazellulärer Ödeme<sup>120</sup>. Weiterhin werden die, bei der anaeroben Glykolyse freiwerdenden, Protonen<sup>121</sup> durch die gelösten Phosphate abgepuffert.

Bei dem zugegebenen Allopurinol handelt es sich um einen Xanthin-Oxidase-Inhibitor, der genau wie das Glutathion die Bildung freier Radikale unterdrückt<sup>122</sup>.

Eine weitere Besonderheit der UW-Lösung ist das Adenosin. Dieses Nukleotid spielt eine wichtige Rolle beim Wiederaufbau der ATP-Reserven. In diesem Zusammenhang berichteten Ely et al.<sup>123</sup> von einer signifikant verbesserten funktionellen Erholung, wenn Adenosin während der globalen Ischämie zugegeben wurde. Dabei werden die Nukleotide von einer Adenosin-Kinase zu AMP phosphoryliert, woraus während der Reperfusion ATP gebildet wird<sup>124</sup>. Neben dem beschriebenen Mechanismus hat das Adenosin noch eine Vielzahl weiterer protektiver Effekte. Hierzu gehören der gehemmte Abbau der vorhandenen ATP-Vorräte während der Ischämie, die Verringerung des Sauerstoffbedarfs und die Stimulation des Glukosestoffwechsels<sup>125</sup>. Neuere Ergebnisse von Jovanovic et al.<sup>120</sup> weisen sogar daraufhin, dass Adenosin den durch Hyperkaliämie ausgelösten Anstieg des intrazellulären Calciums verhindert. Dieser Anstieg würde normalerweise Ca<sup>2+</sup>-abhängige Proteasen und Phospholipasen aktivieren, die wiederum zu erheblichen Zellschädigungen führen<sup>124</sup>.

Zusammenfassend zeigen die beschriebenen Effekte, dass sich die UW-Lösung besonders gut zur Verhinderung ischämischer Schäden bei Langzeitischämie-Versuchen eignet.

Aber nicht nur die Wahl der kardioplegischen Lösung, sondern auch die Art der Applikation spielt bei der Aufbewahrung eine wichtige Rolle. Mittlerweile hat sich die kontinuierliche Perfusion durchgesetzt, da bei dieser Methode die Zufuhr von Adenosin und Sauerstoff, sowie der Abtransport der toxischen Abbauprodukte während der Ischämie gewährleistet ist. Diesbezüglich haben Nutt et al.<sup>14</sup> deutlich geringere ischämische Schäden nach 24stündiger Ischämie in kontinuierlich perfundierten Kaninchenherzen festgestellt.

## **2. Ischämie und Reperfusion**

Für die Interpretation der Ergebnisse müssen erst die pathophysiologischen Grundlagen der Ischämietoleranz des Herzens dargestellt werden.

Bei der normothermen globalen Ischämie am Hundeherz nimmt die ischämische Schädigung sigmoidal mit zunehmender Ischämiedauer zu<sup>114</sup>. Dies bedeutet, dass der Grad der Schädigung zunächst langsam und dann schnell ansteigt. Während des langsamen Anstiegs gleichen die Herzmuskelzellen das Energiedefizit durch anaerobe Glykolyse und Abbau hochenergetischer Verbindungen aus. Aber schon nach kurzer Zeit stagnieren diese zellulären Schutzmechanismen (siehe Punkt 1. des Literaturteils) und die Schädigungen nehmen exponentiell zu. Hieraus resultieren laut den Veröffentlichungen von Jennings et al.<sup>126</sup> und Schaper et al.<sup>10</sup> schwere bis irreversible Schädigungen des Gewebes nach 60minütiger Ischämie. Allerdings lässt sich die beschriebene Beziehung zwischen Ischämiedauer und Ischämieschäden mittels einer Reihe von prä- und intranschämischer Faktoren beeinflussen, wodurch die sigmoidale Kurve nach rechts oder links verschoben wird.

Hinsichtlich der präischämischen Bedingungen sind vor allem akute oder chronische Erkrankungen des Herzens von Bedeutung<sup>114</sup>. Sie schränken die Ischämietoleranz des Organs ein und äußern sich in einem schnelleren Anstieg des Schädigungsgrades zu Beginn der Ischämie. Dieser für humane Herztransplantationen wichtige Faktor spielt bei dem beschriebenen Modell keine Rolle, da bei den Versuchstieren keine Herzerkrankungen vorlagen.

Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse unserer Versuchsreihe, dass sich die Kurve mit Hilfe von Hypothermie und Kardioplegie während der ischämischen Phase nach rechts verschieben lässt.

Obwohl nach einer 18stündigen Ischämie eine irreversible Schädigung aller Myozyten zu erwarten wäre, fanden sich bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung ausschließlich reversibel geschädigte Zellen. Diese Beobachtung wurde durch die Auswertung der Western Blots von Cytochrom C, Aktin und alpha-Aktinin bestätigt. Cytochrom C, als Bestandteil der Mitochondrien konnte bei allen Hunden zu mindestens 50% in der partikulären Fraktion nachgewiesen werden. Folglich muss ein Großteil der Mitochondrien weitgehend intakt sein, da eine irreversible Schädigung zwangsläufig mit der Zerstörung der Mitochondrienmembranen einhergehen würde. Auch die in allen Proben gleichbleibende Gesamtmenge an Aktin und alpha-Aktinin weist daraufhin, dass in den Herzmuskelzellen keine, bei schwerer Schädigung zu erwartenden, Abbauvorgänge von Strukturproteinen stattfinden.

Diese Resultate entsprechen den Beobachtungen von Nutt et al.<sup>14</sup> und Drinkwater et al.<sup>127</sup>, die bei ihren Versuchen mit Kaninchenherzen, bzw. neonatalen

Schweineherzen nur geringfügige ultrastrukturelle Veränderungen nach 24stündiger Aufbewahrung in hypothermer UW-Lösung fanden.

Um die genauen Schutzmechanismen der hypothermen Kardioplegie zu erläutern, werden zunächst die wichtigsten Ursachen der ischämischen Schädigung zusammengefasst. Hierzu gehören insbesondere folgende Faktoren (siehe Punkt 1.2. des Literaturteils):

- A) Hemmung der aeroben Glykolyse, gefolgt vom Abbau der ATP-Reserven
- B) Drastischer Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration
- C) Ansammlung toxischer Metaboliten, die unter anderem zum Abfall des intrazellulären pH's führen
- D) Bildung von freien Radikalen

Entsprechend führt die Hemmung der Faktoren zu einer Steigerung der Ischämietoleranz des Herzgewebes. Im verwendeten Modell wird der Abbau der Energiereserven durch die Hypothermie, den sofortigen Herzstillstand und das in der UW-Lösung vorhandene Adenosin reduziert. Im Gegensatz zum vollständigen, sigmoidalen Abbau der ATP-Reserven bei normothermer globaler Ischämie<sup>128</sup>, verringerte sich die Gesamtmenge in den untersuchten Proben nur um 40 bis 45% bis zum Ende der Ischämie. Allerdings persistierte der ATP-Vorrat aufgrund der sehr langsamen Neusynthese der abgebauten Nukleotide bis zum Ende der Reperfusion auf dem reduzierten Niveau<sup>129</sup>.

Des weiteren verhinderte die kontinuierliche Perfusion während der Ischämie die Ansammlung toxischer Metaboliten. Gleichzeitig wurde der pH-Wert durch den in der UW-Lösung gelösten Phosphatpuffer stabilisiert.

Die unter Punkt D genannten freien Radikale wurden hauptsächlich bei der Oxidation von Hypoxanthin durch die im Hundemyokard aktive Xanthin-Oxidase gebildet<sup>130</sup>. Diese Reaktion wird bei der Aufbewahrung in UW-Lösung durch Allopurinol geblockt.

Da die UW-Lösung trotz der vielen protektiven Effekte nicht in der Lage ist, die schädlichen Faktoren vollständig zu hemmen, fanden wir in der ausschließlich mit hypothermer UW-Lösung behandelten Gruppe eine Reihe von schweren jedoch reversiblen Veränderungen. Außerdem erreicht die während der Reperfusion gemessene end-systolische Elastizität in dieser Gruppe nur 50%.

Dies entspricht den Resultaten von Schaper et al.<sup>10</sup>, die anhand ihrer Versuche belegen konnten, dass funktionelle und strukturelle Beschädigung nach globaler Ischämie den gleichen Schweregrad haben. In den mit CsA perfundierten Herzen erholte sich die Funktion dagegen direkt zu Beginn der Reperfusion und erreichte

nach kurzer Zeit das Niveau der Kontrollgruppe. Entsprechende Ergebnisse ergab die elektronenmikroskopische Beurteilung des ultrastrukturellen Schädigungsgrades in der behandelten Gruppe. Nach der Ischämie zeigten nur drei der sechs Herzen leichte reversible Schäden. Und auch der Verlust von Cytochrom C aufgrund von Schäden an den Mitochondrienmembranen wurde durch CsA um 50% reduziert (siehe Auswertung der partikulären Cytochrom C-Gesamtmenge unter Punkt 6.3.1.1. der Ergebnisse).

Die Ursache für die durch CsA signifikant verbesserte Ischämietoleranz global ischämischer Herzen liegt vermutlich in der Wirkung von CsA auf die Mitochondrien. Diesbezüglich berichten Gatewood et al.<sup>131</sup> und Griffiths et al.<sup>13</sup> von einer verbesserten funktionellen Erholung CsA-behandelter Herzen nach globaler Ischämie. Während Gatewood Kaninchenherzen nach vier Stunden hypothermer Ischämie transplantierte, perfundierte Griffiths Rattenherzen mit CsA angereicherter Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Lösung bei 37°C über einen Zeitraum von 45 Minuten. Beide führen die signifikante Verbesserung der Funktionsparameter in der CsA-Gruppe auf die Hemmung der mitochondrialen „permeability transition“-Pore zurück. Dabei verhindert CsA die durch den drastischen Anstieg der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ausgelöste Öffnung der Pore (siehe Punkt 5.).

Dies ist ein Schutzmechanismus, der vermutlich für den geringen ultrastrukturellen Schädigungsgrad des Myokards verantwortlich ist. Dagegen führen die, aus der gesteigerten Permeabilität der Mitochondrienmembran resultierenden, Schäden in der unbehandelten Gruppe zu eingeschränkten Funktionsparametern.

Dass trotzdem leichte reversible Schäden in den CsA-behandelten Herzen auftreten, kann verschiedene Ursachen haben. Einerseits weist der 30%ige Verlust von Cytochrom C in der partikulären Fraktion der CsA-Gruppe auf eine unvollständige Hemmung der mitochondrialen „permeability transition“-Pore *in vivo* hin. Andererseits wäre eine Schädigung durch freie Radikale, die unabhängig von der Xanthin-Oxidase gebildet wurden, denkbar.

Aber nicht nur kurz nach der Ischämie, sondern auch in der nachfolgenden Reperfusionphase unterschieden sich die Funktionsparameter beider Gruppen. Während in den unbehandelten Herzen keine Erholung erkennbar war, persistierte die end-systolische Elastizität in der CsA-Gruppe auf dem Niveau der Ausgangswerte. Diesbezüglich haben die Arbeiten von Tani et al.<sup>41</sup> und Whalen et al.<sup>42</sup> gezeigt, dass die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration auch während der Reperfusion erhöht bleibt. Entsprechend den oben beschriebenen Mechanismen führt diese

erhöhte Konzentration bis zum Ende der 6stündigen Reperfusion zu einer Einschränkung der Funktion.

Folglich hemmt das CsA auch während der Reperfusion die schädigende Wirkung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Dies bedeutet wiederum, dass CsA *in vivo* auch nach Beendigung der Ischämie in aktiver Form in den Zellen persistiert. Gestützt wird diese Annahme durch die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung. Hierbei konnte die CsA-spezifische vollständige Blockade der Calcineurinaktivität sowohl zum Ende der Ischämie als auch während der Reperfusion nachgewiesen werden.

Die Frage, warum die strukturelle Verbesserung einiger unbehandelter Herzen während der Reperfusion keine funktionelle Erholung zur Folge hatte, lässt sich durch die Beobachtungen von Schaper et al.<sup>10</sup> erklären. In ihren Untersuchungen lief die strukturelle Erholung immer der funktionellen voraus. Eine vollständige Erholung wäre dementsprechend erst nach einer weitaus längeren Reperfusion zu erwarten.

Neben den beschriebenen Mechanismen könnte es sich bei der eingeschränkten Funktion auch um das sogenannte „myocardial stunning“ handeln. Dieses Phänomen wird durch Störungen der Calciumhomeostase<sup>46</sup> und durch die Bildung freier Radikale ausgelöst<sup>47</sup>. Beide Auslöser schädigen den kontraktilen Apparat der Herzmuskelzellen und führen zu einer anhaltenden Dysfunktion des Myokards während der Reperfusion (siehe Punkt 2.4. des Literaturteils). Zur Klärung habe ich das kontraktile Aktin sowie das Gerüstprotein alpha-Aktinin immunhistologisch untersucht. Allerdings ergab die Auswertung der Präparate keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen und auch sonst weist keine Veröffentlichung auf die Hemmung von „myocardial stunning“ durch CsA hin. Folglich ist das Phänomen als Ursache für die verringerte end-systolische Elastizität höchst unwahrscheinlich.

Insgesamt machen die Ergebnisse deutlich, dass die Kombination von Hypothermie, Kardioplegie und Perfusion mit CsA-angereicherter UW-Lösung die Ischämietoleranz global ischämischer Herzen signifikant verbessert. Dabei führt die Hemmung der mitochondrialen „permeability transition“-Pore durch CsA zu einer verbesserten funktionellen Erholung und zu einer drastischen Verringerung des ultrastrukturellen Schädigungsgrades.

Zum Abschluss des Kapitels sollen die Ergebnisse der alpha-Aktininmarkierung beurteilt werden. Diese Färbung zeigte in allen Kontroll- und Ischämiepräparaten eine intensive und gleichmäßige Querstreifung, die in den Reperfusionspräparaten von deutlichen Auflösungserscheinungen unterbrochen wurde. Da die Schäden erst nach Beendigung der globalen Ischämie auftraten, werden sie vermutlich durch

metabolische Veränderungen zu Beginn der Reperfusion verursacht. Hierzu zählen insbesondere der mehrfach beschriebene plötzliche Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration sowie die massive Bildung von freien Radikalen in den ersten Minuten. Hierbei wäre einerseits eine Schädigung des alpha-Aktinins durch aktivierte  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Proteasen denkbar, andererseits könnten die freien Radikale die Auflösungserscheinungen der zellulären Proteine durch direkte Einwirkung auslösen<sup>18</sup>.

### 3. Apoptose und Nekrose

Außer den im vorherigen Kapitel beschriebenen ischämischen Schädigungen führt vor allem der im Verlauf der Ischämie und der Reperfusion auftretende Zelltod zur Einschränkung der Ischämietoleranz. Hierbei unterscheidet man grundsätzlich zwischen nekrotischem und apoptotischem Zelltod.

#### 3.1. Nachweis und Bedeutung der Nekrose im Tiermodell

Im Jahre 1978 beschrieben Jennings et al.<sup>132</sup> das erste Mal den Verlauf letaler ischämischer Schädigung nach Koronarokklusion. Sie erkannten an ihrem Hundemodell, dass nach 40minütiger normothermer Ischämie 50% der Myozyten im Papillarmuskel nekrotisch waren. Weitere 20 Minuten führten in ihrem Modell zur Nekrose aller betroffenen Zellen. Von ähnlichen Resultaten berichteten später andere Gruppen, die in verschiedenen *in vivo* Langzeitischämie-Modellen bis zu 90% Nekrose ermittelten<sup>133,134</sup>.

Ein ganz anderes Bild ergab die histologische Auswertung der im Verlauf des Versuchs entnommenen Biopsien. In keinem der elektronenmikroskopisch beurteilten Schnitte konnten eindeutige Anzeichen von Nekrose gefunden werden. Und auch in der zur Absicherung durchgeführten Complement C9-Färbung zeigte keine der Herzmuskelzellen eine positive Markierung. Da weder die CsA-behandelten noch die unbehandelten Herzen Nekrose zeigten, muss die Perfusion mit UW-Lösung für den guten Erhalt des Gewebes verantwortlich sein.

Hierbei sind die während der Ischämie ausgelösten Zellschäden von den nach der Ischämie auftretenden letalen Reperfusionsschäden abzugrenzen. Erstere werden durch die Wirkung der unter Punkt 1.3. beschriebenen protektiven Inhaltsstoffe der kardioplegischen Lösung sowie durch die Hypothermie verhindert. Die letalen Reperfusionsschäden werden jedoch durch bisher noch weitgehend ungeklärte Mechanismen gehemmt. Entsprechend den im Literaturteil (siehe Punkt 2.5.) beschriebenen potentiellen Ursachen werden diese Schäden normalerweise durch

die zu Beginn der Reperfusion auftretende schnelle Rephosphorylierung des ATP's sowie durch die schnelle Normalisierung des intrazellulären pH's und der Gewebeosmolarität hervorgerufen<sup>49</sup>. Vermutlich bewirkt die einzigartige Zusammensetzung der UW-Lösung eine besondere Stabilisierung der Stoffwechsellage zum Ende der Ischämie, so dass es nicht zu den beschriebenen drastischen Schäden während der Reperfusion kommt.

Eine besondere Rolle spielt dabei der Erhalt der hochenergetischen ATP-Reserven. Diesbezüglich berichteten Leist et al.<sup>135</sup> von einem ATP-abhängigen Wechsel zwischen Apoptose und Nekrose. Bei ihren *in vitro*-Versuchen reichte eine Verminderung der intrazellulären ATP-Vorräte von mehr als 50% aus, um humane T-Zellen nach Stimulation nekrotisch werden zu lassen. Im Gegensatz dazu starben die T-Zellen mit mehr als 50% der physiologischen ATP-Vorräte einen apoptotischen Zelltod. Übertragen auf unser Modell wären dementsprechend der über 50%ige ATP-Gehalt zum Ende der Ischämie eine mögliche Ursache für die Abwesenheit der Nekrose.

### **3.2. Nachweis und Bedeutung der Apoptose im Tiermodell**

Nachdem einige Wissenschaftler apoptotische Zellen in ischämischem und reperfundiertem Gehirn<sup>136</sup> und Nierengewebe<sup>137</sup> entdeckt hatten, beschrieb Gottlieb et al.<sup>138</sup> 1994 die durch Ischämie ausgelöste Apoptose von Kaninchenkardiomyozyten. Seitdem wurde das Auftreten apoptotischer Herzmuskelzellen in Verbindung mit Ischämie und Reperfusion vielfach in Tiermodellen<sup>139</sup> und im menschlichen Myokard<sup>140</sup> dokumentiert.

Bei den hier durchgeführten Versuchen wurde der Anteil apoptotischer Zellen mit Hilfe der TUNEL-Methode und der Lamin B1-Färbung ermittelt. Diese Kombination zweier Methoden entspricht den Empfehlungen von Schaper et al.<sup>60</sup>. Sie reagieren damit auf die aktuelle Kritik an der TUNEL-Methode, die nachweislich unter bestimmten Umständen nekrotische Zellen<sup>141</sup> und Kerne mit DNA-Reparatur<sup>142</sup> markiert. Trotzdem gilt die Methode nach sorgfältiger Standardisierung und in Verbindung mit der Lamin B1-Färbung als zuverlässig.

Während die zu den „intermediate filament“-Proteinen gehörenden Lamine unter physiologischen Bedingungen der Organisation des Chromatins dienen, erfolgt im Verlauf der Apoptose eine Spaltung dieser Kernmembranproteine. Diese von verschiedenen Arbeitsgruppen beschriebene Proteolyse<sup>143,144</sup> beruht laut den Untersuchungen von Zhivotovky et al.<sup>145</sup> auf einem Zusammenspiel zweier Proteasen.

Bei der quantitativen Auswertung der CsA-freien Herzen stieg der prozentuale Anteil an TUNEL-positiven Myozyten von 0% zum Ende der Ischämie auf 5,9%

nach 6h Reperfusion. Dabei sind die deutliche Korrelation mit den Ergebnissen der Lamin B1-Färbung sowie das Fehlen von Nekrose eindeutige Hinweise auf das Vorliegen apoptotischer Prozesse in den TUNEL-positiven Myozyten.

Für diesen auffällig geringen Anteil an apoptotischen Zellen gibt es zwei mögliche Erklärungen. Erstere beruht auf den von Gottlieb<sup>146</sup> zusammengefassten Veröffentlichungen, die den Zusammenhang zwischen intrazellulärem pH-Wert und Apoptose beschreiben. Sie beweisen einerseits, dass die Apoptose immer von einem pH-Abfall begleitet wird. Andererseits führte eine Hemmung dieser pH-Veränderungen zu einer verzögerten oder vollständig gehemmten Apoptose. Eine mögliche Schlussfolgerung wäre, dass die geringe Apoptose-Rate in unserem Modell durch die Stabilisierung des pH-Wertes während der Ischämie verursacht wurde. Diese Stabilisierung wird dabei durch den Abtransport der Protonen und die Pufferwirkung der UW-Lösung erreicht.

Die zweite Erklärung ergibt sich aus der Publikation von Haunstetter et al.<sup>147</sup>. Ihrer Meinung nach beruht die Resistenz der Kardiomyozyten auf speziellen anti-apoptotischen Strategien der Zelle, wobei der genaue Mechanismus unter Punkt 4.2. beschrieben wird. Folglich wäre dieser Schutz verantwortlich für das massive Überleben der Herzmuskelzellen.

Aber nicht nur die absolute Anzahl, sondern auch die Verteilung der apoptotischen Zellen ist bei der Beurteilung der Ergebnisse von großer Bedeutung. Dieser Kontext lässt sich am einfachsten am Beispiel der Nekrose verdeutlichen. Hierbei kann ein großer Zellverlust infolge eines lokal begrenzten Infarkts ausgeglichen werden, während die, durch die Applikation von Katecholaminen ausgelöste, diffuse geringgradige Nekrose zum Herzversagen führt.

Dies beweisen einerseits die Infarktmessungen von Pfeffer et al.<sup>148</sup>, der eine Beeinträchtigung der Ventrikelkontraktionen erst ab einer Infarktgröße von 31% der Ventrikelwand nachweisen konnte. Andererseits berichtete Kostin, dass schon eine 15%ige diffuse Nekrose massivste Einschränkungen der hämodynamischen Parameter zur Folge hat.

Vermutlich liegt die Ursache in der Ablösung der toten Zellen. Hierdurch verlieren die intakten Nachbarzellen die für die Reiz- und Kraftweiterleitung notwendigen Zell-zu-Zell-Kontakte, gefolgt von massiven Störungen der komplexen Ventrikelfunktion.

Die im vorliegenden Modell gefundene gleichmäßige diffuse Verteilung der apoptotischen Herzmuskelzellen entspricht den Verhältnissen nach Katecholamingabe. Da aber nur 6% der Myozyten betroffen sind, führt der Verlust der Zellen nicht zum Herzversagen, sondern resultiert in einer reduzierten end-systolischen Elastizität.

Im Gegensatz dazu stieg der prozentuale Anteil an TUNEL-positiven Herzmuskelzellen in den CsA-behandelten Hundeherzen nur auf 2,4% zum Ende der Reperfusion. Und obwohl die betroffenen Zellen ebenfalls diffus im Gewebe verteilt vorlagen, beeinträchtigten sie die Funktion der Herzen nicht. Hieraus lässt sich folgern, dass das Herzgewebe in der Lage ist, Zellverluste bis zu einem bestimmten Grenzwert ohne Einschränkung der Funktion auszugleichen. Dieser liegt laut unseren Resultaten für diffus verteilte apoptotische Zellen im Bereich zwischen 2,4 und 6% der Gesamtmyozyten. Außerdem beweisen die Ergebnisse, dass CsA während der globalen Ischämie am Hundeherz anti-apoptotisch wirkt, wobei der genaue Mechanismus unter Punkt 4.2. erläutert wird.

Des Weiteren soll die Frage diskutiert werden, ob die Apoptose während der Ischämie ausgelöst wird, oder ob es sich um sogenannte letale Reperfusionsschäden handelt. Diesbezüglich zeigten Gottlieb et al.<sup>138</sup> in einer Kaninchen-Studie, dass die Apoptose nur durch Reperfusion verursacht wird, wohingegen Fliss et al.<sup>139</sup> apoptotische Zellen in Rattenherzen nach 2,75stündiger Ischämie fanden. Einen Kompromiss bietet die Veröffentlichung von Freude et al.<sup>134</sup>. Er beschreibt am Hundemodell, dass die Apoptose während der Ischämie eingeleitet und während der Reperfusion vervollständigt wird.

Diese Hypothese entspricht den am beschriebenen Modell gefundenen Ergebnissen. Einerseits konnten direkt nach der Ischämie keine TUNEL-positive Zellen nachgewiesen werden. Andererseits können letale Reperfusionsschäden aufgrund der gleichbleibenden Funktionsbeeinträchtigung während der Reperfusion ausgeschlossen werden. Würde die Apoptose erst nach der Ischämie eingeleitet werden, wäre eine funktionelle Verschlechterung im Verlauf der Reperfusion zu erwarten. Ein weiterer Hinweis ergibt der, von Suzuki et al.<sup>149</sup> bestimmte, zeitliche Verlauf der Apoptosekaskade in adulten Rattenkardiomyozyten. In seinem *in vitro*-Modell konnte er die DNA-Fragmentierung erst nach 14 Stunden mittels der TUNEL-Methode und Elektronenmikroskopie darstellen. Unter der Annahme, dass die Apoptose *in vivo* ähnlich verläuft, wäre eine vollständige Kaskade während der 6stündigen Reperfusion nicht möglich.

Zusammengefasst verdeutlichen die Ergebnisse, dass die Reduktion der end-systolischen Elastizität in der unbehandelten Gruppe sowohl durch ischämische Beschädigung wie auch durch die im Verlauf der Ischämie eingeleitete Apoptose verursacht wird. Beide Faktoren werden durch die Perfusion mit CsA signifikant gehemmt, wodurch sich die Funktion in der behandelten Gruppe direkt nach der Ischämie vollständig erholt.

## 4. Regulation und Hemmung der Apoptose

### 4.1. Auslöser und übergeordnete Mechanismen der Apoptose

Grundsätzlich unterscheidet man zwei während der Einleitungsphase ausgelöste Mechanismen der Apoptose<sup>150</sup>. Die Aktivierung des ersten Mechanismus erfolgt über Zellmembran-gebundene Todesrezeptoren, die direkt die Caspase 8 und 10 aktivieren. Der zweite Mechanismus führt über einen komplizierten mitochondrialen Weg zur typischen Spaltung der DNA.

Der rezeptorvermittelte Weg wird durch die Anlagerung vom Fas-Liganden oder TNF-alpha (Tumor-Nekrose-Faktor-alpha) an die entsprechenden transmembranösen Fas-(CD95) oder TNF-Rezeptorproteine eingeleitet<sup>151</sup>. Dies bewirkt eine Trimerisation des Rezeptors mit nachfolgender Rekrutierung der „death domain“ des FADD (Fas-associated death domain) Proteins. Anschließend trimerisiert der Komplex mit der Prodomäne von Procaspase 8, wobei die aktivierte Caspase 8 entsteht. Im Falle einer Aktivierung des TNF-Rezeptors weicht der Weg etwas ab, da dieser Rezeptor FADD nicht direkt sondern nur über ein als TRADD (TNF-receptor- associated death domain ) bezeichnetes Verbindungsprotein binden kann.

Die dementsprechend aktivierte Caspase 8 gehört zu den Exekutoren der Apoptose. Deren Name setzt sich aus ihrem zentral gelegenen Cysteinmolekül und der Aspartat-spezifischen Substratspaltung zusammen: „cytosolic-aspartate-specific-cystein-protease“ = Caspase<sup>151</sup>.

Die Caspasen liegen im Zytosol immer als Procaspase vor, die bei der Aktivierung in eine 20 kDa und eine 10 kDa Untereinheit gespalten werden. Erst nachdem die beiden zusammengelagerten Fragmente ein sogenanntes Heterotetramer gebildet haben, ist das Enzym voll funktionsfähig<sup>150</sup>.

Die so aktivierte Caspase 8 besitzt wiederum das Potential zur Spaltung der am weitesten terminal gelegenen Caspase 3. Diese spaltet während der Degradationsphase zelluläre Substrate, wie Aktin, Lamin und das DNA-Reparaturenzym PARP<sup>152</sup>. Außerdem aktiviert das Enzym den DNA-Fragmentierungs-Faktor (DFF)<sup>146</sup>, der die typischen apoptotischen Kernveränderungen hervorruft (Abb. 33).

Nach einem ganz anderen Muster verläuft die Induktion der Apoptose über den mitochondrialen Weg. Hierbei verursacht eine Vielzahl von Induktoren (z.B. Ischämie) die Aktivierung zweier Mitochondrien-abhängiger Mechanismen. Einer dieser Mechanismen führt nach Freisetzung von Cytochrom C zur Aktivierung der Caspase 9, die wiederum die Caspase 3 spaltet (siehe Punkt 5.2. des Literaturteils). Gleichzeitig wird der „apoptosis-inducing-factor“ (AIF) aus den

Mitochondrien freigesetzt (Abb. 33). Dieser Faktor verursacht Caspase-unabhängige apoptotische Veränderungen im Zellkern und an den Membranen<sup>153</sup>. Trotz intensiver Forschung konnte der Zusammenhang zwischen den beiden Mechanismen noch nicht endgültig geklärt werden.

In unserem Modell zeigen die Cytochrom C Western Blot-Ergebnisse eindeutig, dass nur der mitochondriale Weg eine Rolle spielt. Dabei führt der signifikante Anstieg des Proteins in der zytosolischen Fraktion mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Aktivierung der Caspasekaskade. Von entsprechenden Resultaten berichten Piper et al.<sup>154</sup>, die in ihren Versuchen an isolierten Meerschweinchenmitochondrien die Freisetzung von Cytochrom C während der Ischämie nachweisen konnten.

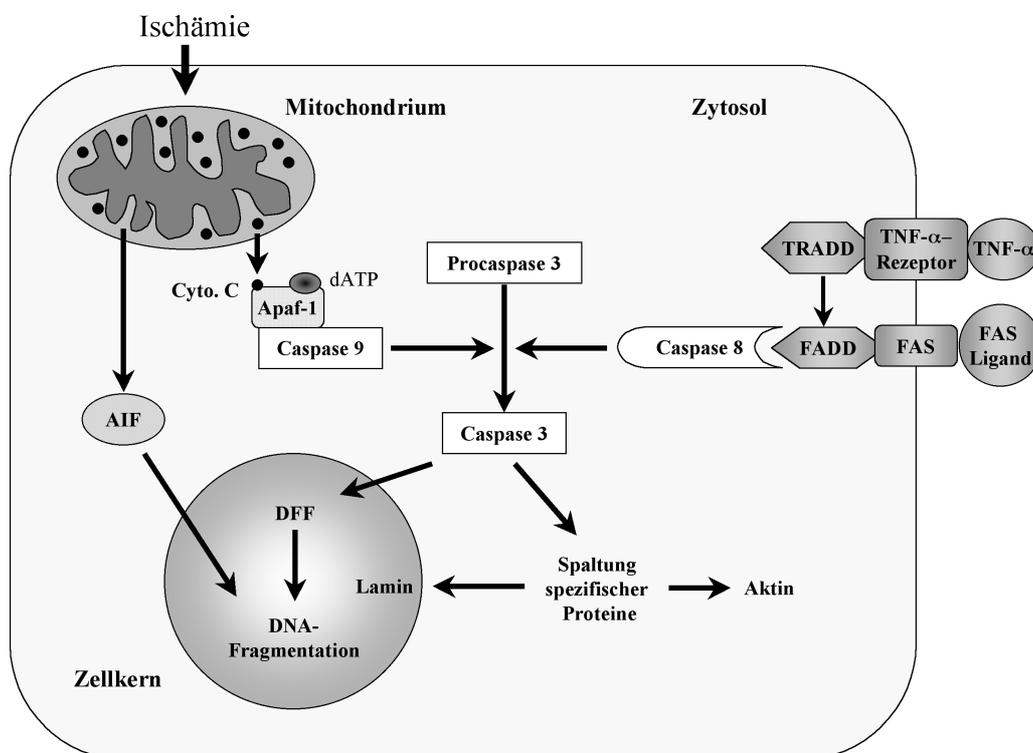


Abb. 33: Die Abbildung zeigt die verschiedenen Apoptosekaskaden der Kardiomyozyten. Einerseits führen bestimmte Stressfaktoren (z.B. Ischämie) zur Freisetzung von Cytochrom C und AIF aus den Mitochondrien. Andererseits aktiviert die Anlagerung von TNF-alpha und FAS-Ligand die Caspase 8. In beiden Fällen spalten die Zwischenprodukte die terminale Caspase 3, gefolgt von der Fragmentierung der DNA.

#### 4.2. Mechanismus und Hemmung der Cytochrom C bedingten Apoptose

Seitdem der Übergang von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytosol als essentieller Schritt der Ischämie-bedingten Apoptose entdeckt wurde, herrscht Uneinigkeit über die genauen Mechanismen der Freisetzung. Insbesondere der nahezu vollständige Erhalt der Mitochondrienmorphologie während der Freisetzung von Cytochrom C bietet reichlich Diskussionsstoff<sup>54</sup>. Mittlerweile geht

man allerdings davon aus, dass die mitochondriale „permeability transition“ (MPT) sowie die obligatorisch folgende Öffnung der „permeability transition“-Pore (PTP) die Freisetzung der Apoptoseinduktoren verursacht <sup>155</sup>.

Dieses Modell stützt sich unter anderem auf eine Veröffentlichung von Kroemer et al. <sup>155</sup>, worin sie beschreiben, dass spezielle Inhibitoren (z.B. „bongkrekic acid“) der mitochondrialen PTP die Apoptose verhindern, während die durch Atractyloside eingeleitete Porenöffnung Apoptose induziert.

Während der Ischämie wird die PTP durch den beschriebenen intrazellulären Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration geöffnet. Durch das daraufhin einfließende Wasser schwellen die Mitochondrien an und es kommt zum Konzentrationsausgleich zwischen Zytoplasma und innerer Mitochondrienmatrix. In diesem Zusammenhang ist zu bedenken, dass die innere Mitochondrienmembran aufgrund der vielen Cristae eine weitaus größere Oberfläche hat als die äußere Membran. Folglich führt die Schwellung der inneren Matrix unweigerlich zur Ruptur der äußeren Membran, wobei der Inhalt des intermembranösen Spaltes in das Zytoplasma abgegeben wird <sup>68</sup> (Abb. 34). Diesbezüglich berichteten Vander Heiden et al. <sup>156</sup>, dass Antikörper gegen die mitochondriale Cytochrom-Oxidase durch die rupturierte äußere Membran in die Mitochondrien apoptotischer Zellen eindringen konnten, während dies in Kontrollzellen nicht möglich war. Das durch die Ruptur freigesetzte Cytochrom C bildet mit Apaf-1 einen Komplex, der in Anwesenheit von dATP die zur Apoptose führende Caspasekaskade aktiviert.

Neben der Freisetzung von Cytochrom C bedingt die Öffnung der PTP vor allem den Zusammenbruch des Transmembranpotentials. Dieses etwa -150 bis -200 mV betragende Potential <sup>89</sup> resultiert aus der physiologischerweise vorliegenden asymmetrischen Protonenverteilung beiderseits der inneren Mitochondrienmembran <sup>157</sup>.

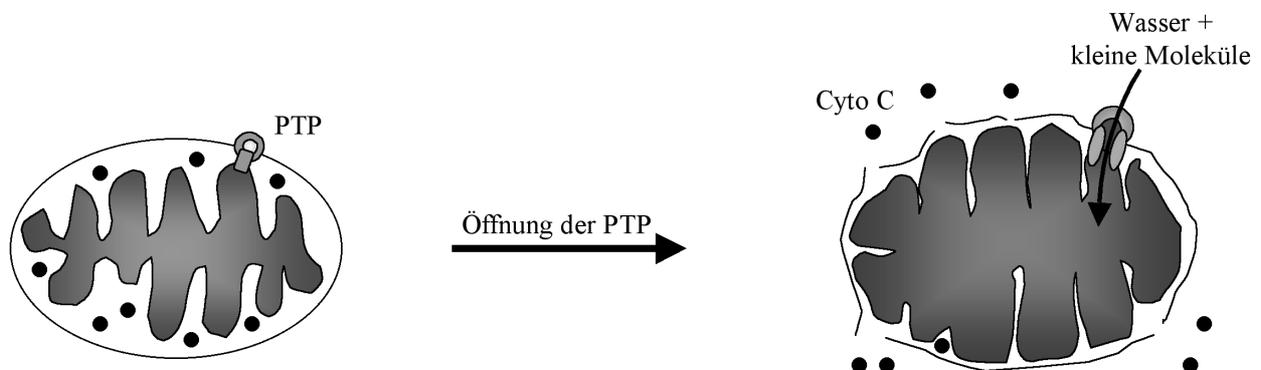


Abb. 34: Nach der  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten Öffnung der „permeability transition“-Pore (PTP) schwellen die Mitochondrien durch das in die innere Matrix einfließende Wasser an. In diesem Modell führt die Schwellung zur Ruptur der äußeren Membran, wobei Cytochrom C und AIF freigesetzt wird.

Folglich führt das Einfließen von Protonen durch die geöffnete PTP zum sofortigen Verlust des elektrischen Gradienten. Dies ist ein Vorgang, den Zamzami et al.<sup>158</sup> als „point-of-no-return“ in Bezug auf den programmierten Zelltod definierten. Andererseits hemmt der spezifische PTP-Inhibitor CsA den Zusammenbruch des elektrischen Potentials<sup>159</sup>.

Aber nicht nur die Versuche von Zamzami et al.<sup>158</sup>, sondern auch der Bericht von Halestrap et al.<sup>160</sup> stützen das „permeability transition“-Modell. Darin beschreiben sie, dass CsA die Calcium-induzierte Schwellung der Mitochondrien durch Bindung an Cyclophilin D hemmt. Dieses als Baustein der PTP (Abb. 3) bekannte Protein unterscheidet sich deutlich von den zytoplasmatischen Cyclophilinen<sup>161</sup>, wobei die Bindung mit CsA die Öffnung der Pore verhindert. Diese Tatsache wurde mittlerweile von vielen Wissenschaftlern belegt<sup>162-164</sup>. Im Gegensatz dazu zeigt das neuerdings zur Immunsuppression eingesetzte FK-506 aufgrund der fehlenden Bindungsstelle für Cyclophilin D keinen Effekt auf die PTP<sup>165</sup>.

In Bezug auf unsere Versuche bestätigen vor allem die Ergebnisse der Cytochrom C Western Blots das Zutreffen der Modellvorstellung. Dabei weist der bei allen Hunden nachgewiesene Abfall von Cytochrom C in der partikulären Fraktion auf eine Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran während der Ischämie. Des weiteren ließ sich die Freisetzung des Proteins durch die Hemmung der PTP mit CsA signifikant um 50% reduzieren. In diesem Zusammenhang korrelierten die stärkeren Banden der zytosolischen Fraktion der B-Biopsie eindeutig mit dem Verlust des Cytochrom C's in der partikulären Fraktion. In diesem Kontext ist auch die durch CsA hervorgerufene vollständige Blockade der Calcineurinaktivität während Ischämie und Reperfusion hervorzuheben. Sie beweist, dass CsA *in vivo* in die Herzmuskelzellen eindringt und dort während des gesamten Versuchs in aktiver Form persistiert.

Dementsprechend ist die Reduktion der Apoptoserate in der behandelten Gruppe mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Hemmung der PTP durch CsA zurückzuführen. Dass es sich hierbei nicht um eine vollständige Blockade aller mitochondrialen Poren handelt, verdeutlicht der um 30% reduzierte Mittelwert der Cytochrom C-Gesamtmenge nach 18stündiger Ischämie. Trotzdem korreliert die 50%ige Reduzierung der Cytochrom C-Freisetzung mit der 50%igen Abnahme der Apoptoserate in den CsA-perfundierten Tieren.

Allerdings erklären weder die bisher beschriebenen Resultate noch das Modell der „permeability transition“-Pore (PTP), warum die Ausschüttung von 50% bzw. 25% der Cytochrom C-Gesamtmenge nur in 6% bzw. 3% der Herzmuskelzellen zum apoptotischen Zelltod führte. Folglich müssen die Herzmuskelzellen über spezielle

hochwirksame anti-apoptotische Mechanismen verfügen. Dazu gehören nach heutigem Wissensstand die anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie, deren Bedeutung im folgenden Kapitel diskutiert wird, sowie die endogenen Caspaseinhibitoren IAP-1<sup>166</sup> und XIAP (X-linked IAP)<sup>167</sup>. Diese sogenannten „Inhibitors of *A*poptosis“ (IAP) hemmen *in vitro* durch direkte Interaktion mit den Caspasen 3 und 7 den obligatorisch eintretenden apoptotischen Zelltod<sup>168</sup>. Dabei besitzen diese Proteine ein bis drei BIR (baculovirus IAP repeat)-Regionen, die eine essentielle Bedeutung für ihre Funktion haben<sup>167</sup>. Um zu klären inwieweit dieser Schutzmechanismus in unserem Modell eine Rolle spielt, müsste man die Caspaseinhibitoren während der Ischämie inaktivieren.

Außerdem ist bisher noch nicht erforscht, welche zytosolische Cytochrom C-Konzentration zur Induktion der Apoptose notwendig ist<sup>147</sup>. Theoretisch wäre denkbar, dass nur in wenigen Zellen der Grenzwert überschritten wird, während die Konzentration in den meisten Zellen unterhalb des Schwellenwertes bleibt.

## **5. Mechanismen der Apoptoseregulation durch die Bcl-2 Proteinfamilie**

Neben den Caspasen als Exekutoren repräsentieren die Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie die wesentlichen Regulatoren der Apoptose. Diesbezüglich untersuchten Ellis und Horvitz<sup>169</sup> im Jahre 1986 die Entwicklung des Nematoden *Caenorhabditis elegans*. Dabei entdeckten sie drei der wichtigsten apoptoseregulierenden Gene, die sie CED-3, -4 und -9 (*C. elegans* death gene) nannten. Die ersten beiden sind essentiell für den Ablauf der Apoptose, während CED-9 anti-apoptotische Eigenschaften hat. Mittlerweile haben verschiedene Forscher konservierte Homologe dieser Gene im Genom der Säugetiere gefunden, wobei die Caspase 3 dem CED-3-Genprodukt und Bcl-2 dem CED-9-Genprodukt entspricht<sup>146</sup>.

Nachfolgend sollen die vier verschiedenen Wirkungsmechanismen von Bcl-2 und dem nahe verwandten Gegenspieler Bax sowie die Bedeutung der beiden Regulatoren für das beschriebene Modell dargestellt werden.

### **5.1. Antioxidative Effekte**

Die zentrale Funktion reaktiver Sauerstoffradikale bei der Apoptose wurde erstmalig von Hockenbery et al.<sup>170</sup> angedeutet. Bei ihren *in vitro* Versuchen führte die Behandlung mit dem Sauerstoffradikal-erzeugenden Menadion zum dosisabhängigen Zelltod. Dies ist ein Prozess, der in Bcl-2 überexprimierenden

Zelllinien nicht stattfand. Aus ihren Ergebnissen schlossen die Wissenschaftler, dass Bcl-2 entweder direkt als Radikalfänger fungiert oder indirekt die Erzeugung der Radikale hemmt.

Diese Hypothese wurde durch spätere Beobachtungen von Jacobson und Raff<sup>171</sup> in Frage gestellt. Nach Kultivierung ihrer Zelllinie unter anaeroben Bedingungen konnten sie die anti-apoptotische Wirkung von Bcl-2 auf Staurosporin-induzierte Apoptose nachweisen, obwohl die Erzeugung von Sauerstoffradikalen unter diesen Umständen stark reduziert war.

## 5.2. Sequestration von Apaf-1

Dieser hypothetische Mechanismus beruht auf der Erkenntnis, dass das als *C. elegans*-Homolog des Bcl-2's bekannte CED-9 durch direkte Interaktion mit CED-4 die Apoptose verhindert<sup>172,173</sup>. Dabei hemmt CED-9 die *in vitro* unter ATP-Verbrauch nachgewiesene Aktivierung des CED-3's durch CED-4. In Anbetracht der Tatsache, dass es sich beim Genprodukt des CED-4's um ein Homolog des Säugetierproteins Apaf-1 handelt<sup>174</sup>, könnte die Bindung von Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub> an Apaf-1 eine wichtige Bedeutung bei der Hemmung der Apoptose haben (Abb. 35). Entsprechende Berichte über die Komplexbildung von Apaf-1 und Bcl-x<sub>L</sub> wurden zwischenzeitlich veröffentlicht<sup>175</sup>. Dementsprechend würde die Heterodimerisation von Bax mit Bcl-x<sub>L</sub> zu einer Freisetzung von Apaf-1 mit nachfolgender Apoptose führen<sup>69</sup>. Ein ähnlicher Mechanismus wurde beim Nematoden *C. elegans* entdeckt, wobei Egl-1 als Protein der BH3-Familie die Ablösung von CED-9 bewirkt<sup>176</sup> (Abb. 35). Inwieweit Bcl-2 die als „Apoptosome“ bezeichneten Sequester mit Apaf-1 bildet und welche Rolle dieser Mechanismus *in vivo* spielt ist bisher unbekannt.

## 5.3. Mitochondriengekoppelte Wirkungsmechanismen

Den evolutionsgeschichtlich ältesten Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der Bcl-2-Familie und den Mitochondrien lieferte der Nachweis, dass beim Nematoden *C. elegans* das Bcl-2 Homolog CED-9 und Cytochrom B von der gleichen mRNA codiert werden<sup>177</sup>. Dies stimmt überein mit einer Vielzahl von Untersuchungen, die zeigen, dass die anti-apoptotische Wirkung von Bcl-2 vor der Aktivierung der Caspasen auftritt. Folglich fungieren die Bcl-2-Familienmitglieder als Regulatoren der Mitochondrien-induzierten Apoptose<sup>172,173</sup>. Dabei stehen zwei grundverschiedene Wirkungsmechanismen zur Diskussion.

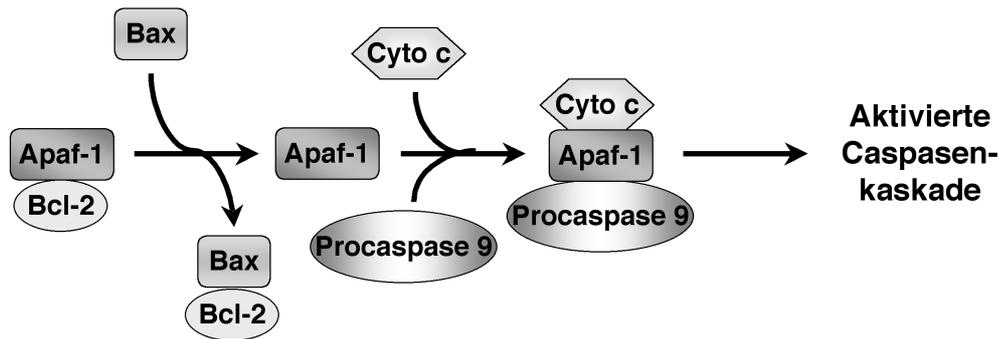
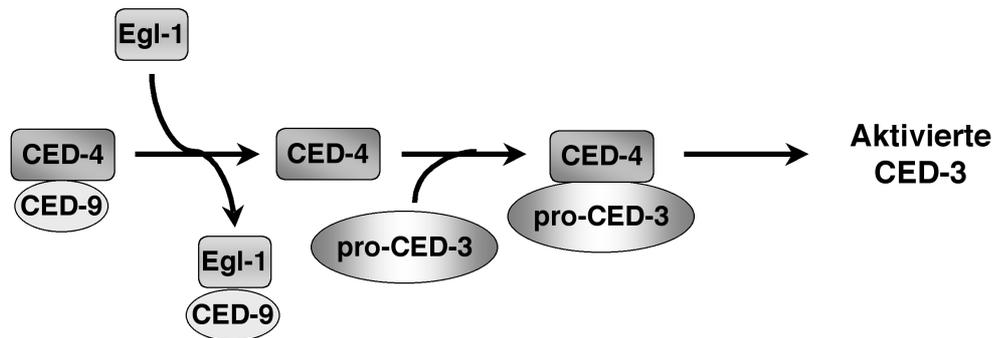
Im Säugetier:Im *C. elegans*:

Abb. 35: Vergleich zwischen dem programmierten Zelltod bei Säugetieren und beim Nematoden *C. elegans*. Während die Aktivierung von CED-3 beim Nematoden durch Abspalten von CED-9 erreicht wird, führen bei Säugetieren zwei unabhängige Schritte zur Caspasenaktivierung. Zuerst muss das Bcl-2-Familienmitglied von Apaf-1 abgespalten werden und danach erfolgt die Anlagerung von Cytochrom C.

### 5.3.1. Regulierung der mitochondrialen „permeability transition“-Pore

Bei diesem zentralen Regulationsmechanismus steuern die Mitglieder der Bcl-2-Familie die Freisetzung pro-apoptotischer mitochondrialer Faktoren. Einerseits blockt die Überexpression von Bcl-2 den Übergang von Cytochrom C aus dem Zwischenmembranspalt in das Zytosol<sup>178,179</sup>, andererseits hemmt Bcl-2 den Austritt von AIF aus isolierten Mitochondrien<sup>176</sup>. Im Gegensatz dazu bewirkt Bax eine Schwellung der inneren Mitochondrienmatrix sowie die Freisetzung des mitochondrialen Cytochrom C's.

Entsprechend der beschriebenen Effekte von Bcl-2 und Bax auf die Cytochrom C- und die AIF-Verteilung beeinflussen die beiden Proteine das mitochondriale Transmembranpotential. Während Bcl-2 die durch PT-Porenöffnung ausgelöste Depolarisation der Mitochondrien verhindert<sup>179,180</sup>, induziert Bax den Verlust des Transmembranpotentials<sup>181,182</sup>. Diese Resultate deuten auf eine Beteiligung der mitochondrialen PT-Pore bei der Steuerung der Apoptose durch Mitglieder der Bcl-2-Familie. Dafür spricht auch die Veröffentlichung von Narita et al.<sup>181</sup>. Sie

beschreiben darin, dass die PT-Porenhemmer CsA und Bongkrekisäure in der Lage sind, Bax-induzierte Veränderungen isolierter Mitochondrien zu hemmen. Allerdings ist bisher noch nicht geklärt, wie Bcl-2 und Bax die PT-Porenöffnung im Detail beeinflussen.

Trotz dieser eindeutigen Ergebnisse teilen sich die Meinungen in Bezug auf die Bedeutung der PTP. Insbesondere die Untersuchungen von Eskes et al.<sup>183</sup> stellen die Hypothese in Frage, da sie keine CsA-bedingte Hemmung der durch Bax ausgelösten Cytochrom C-Umverteilung *in vitro* feststellen konnten. Aber auch einige andere Studien belegen, dass Bax die Cytochrom C-Freisetzung unabhängig vom Transmembranpotential auslöst<sup>184,185</sup>. Folglich gibt es neben der Porenöffnung weitere wirksame Mechanismen, die zur Ansammlung von Cytochrom C im Zytosol führen.

### 5.3.2. Porenbildende Eigenschaft der Bcl-2-Familie

Der erste diese Theorie unterstützende Anhaltspunkt ergab sich aus der dreidimensionalen Struktur des anti-apoptischen Bcl-x<sub>L</sub>-Proteins<sup>186</sup>. Bcl-x<sub>L</sub> ist aus sieben flexibel verbundenen Helices aufgebaut, wobei nur die zwei zentralen hydrophoben alpha-Helices (alpha 5 und alpha 6) für die porenbildende Funktion des Proteins von Bedeutung sind<sup>187</sup>. Eine Eigenschaft, die außer bei Bcl-x<sub>L</sub> auch bei den strukturell sehr ähnlichen Bcl-2- und Bax-Proteinen auftritt.

Dabei entspricht die Struktur von Bcl-x<sub>L</sub> größtenteils den porenbildenden Abschnitten einiger bakterieller Toxine<sup>186</sup>. Von der daraus resultierenden Fähigkeit berichteten Schendel et al.<sup>188</sup>. Bei ihren Versuchen an synthetischen Membranen bildeten sowohl Bcl-x<sub>L</sub>, wie auch Bcl-2 und Bax unterschiedliche funktionierende pH- und spannungsabhängige Ionenkanäle. Während Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> nur unter „unphysiologischen“ Bedingungen (niedriger pH-Wert) zu Porenbildung neigen, entstehen die Bax-induzierten Ionenkanäle bei neutralem pH-Wert<sup>189</sup>. Dementsprechend könnte die pro-apoptische Wirkung von Bax durch die porenbildende Fähigkeit des Proteins hervorgerufen werden (Abb. 36). Hierbei würde Cytochrom C durch die nichtselektiven Ionenkanäle aus den Mitochondrien freigesetzt, gefolgt von einer Aktivierung der Caspasenkaskade. Allerdings bleibt fraglich, ob die in synthetischen Lipidmembranen gebildeten Kanäle auch *in vivo* existieren und ob das Lumen für die Passage von Cytochrom C ausreicht.



Abb. 36: Die Abbildung veranschaulicht die hypothetische Entstehung der Bax-Poren. Dabei führt die Heterodimerisation verschiedener Bax-Moleküle zur Ausbildung transmembranöser Poren, durch die Cytochrom C freigesetzt wird.

Im Gegensatz dazu spielt die Porenbildung bei den anti-apoptotischen Proteinen *in vivo* keine Rolle. Vielmehr beschützt Bcl-2 als „Wächter der Mitochondrien“ die Organellen vor der toxischen Bax-Wirkung. Dabei verhindert Bcl-2 die Bildung von Bax-induzierten Ionenkanälen<sup>190</sup> durch Heterodimerisation mit dem pro-apoptotischen Protein. Dies ist ein Vorgang, bei dem die aus den BH-1, -2 und -3 Regionen gebildete hydrophobe Tasche des Bcl-2's die pro-apoptotische BH-3-Domäne des Bax-Proteins bindet<sup>191</sup>.

#### 5.4. Bedeutung von Bcl-2 und Bax im beschriebenen Modell

Zusammengefasst zeigen die beschriebenen Mechanismen, dass die Entscheidung über Leben oder Tod der Zelle durch die Bcl-2-Familie auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen kann. Zum einen hemmt die Heterodimerisation von pro- und anti-apoptotischen Proteinen die direkte toxische Wirkung von Bax. Zum anderen regulieren die einzelnen Mitglieder die Apoptose über unabhängige Funktionen. Allerdings entscheidet in beiden Fällen die relative Konzentration pro- und anti-apoptotischer Proteine über die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber der Apoptoseinduktion, wobei insbesondere das Verhältnis zwischen Bcl-2 und seinem direkten Gegenspieler Bax von großer Bedeutung ist<sup>69,151</sup>.

Dementsprechend müssen die Ergebnisse der Bcl-2 und Bax-Western Blots vor allem in Bezug auf das Verhältnis der beiden Proteine beurteilt werden. Da die Gesamtmenge an Bax nach der Ischämie im Gegensatz zur Gesamtmenge an Bcl-2 nur minimal ansteigt, verlagert sich das Verhältnis in beiden Versuchsgruppen zugunsten des anti-apoptotischen Bcl-2's. Der daraus resultierende protektive Effekt ist vermutlich einer der Gründe für die geringe Apoptoserate trotz 18stündiger Ischämie. Dieser Effekt bleibt auch während der ersten 2 Stunden der Reperfusion erhalten, da die relative Bcl-2-Konzentration zu diesem Zeitpunkt

immer noch überwiegt. Erst nach 6stündiger Reperfusion erfolgt ein signifikanter Abbau der pro- und anti-apoptotischen Bcl-2-Familienproteine in beiden Gruppen. Hieraus folgt, dass zum Ende der Reperfusion keinerlei Apoptose-induzierende Faktoren wirksam sind. Dies wiederum unterstützt die unter Punkt 3.2. aufgestellte Hypothese, die von einer Auslösung der Apoptose während der Ischämie ausgeht.

Obwohl noch viele Untersuchungen zur endgültigen Klärung der Wirkungsmechanismen notwendig sind, sprechen die am Modell ermittelten Ergebnisse für eine Beteiligung der Mitochondrien an der Steuerung der Apoptose. Unter anderem weist der relativ geringe 50%ige Abfall der Cytochrom C-Gesamtmenge in der unbehandelten Gruppe auf eine gehemmte Freisetzung der pro-apoptotischen mitochondrialen Faktoren während der Ischämie hin. Allerdings erlauben die Ergebnisse keine Rückschlüsse, ob es sich dabei um direkte (siehe Punkt 5.3.1.) oder indirekte (siehe Punkt 5.3.2.) Einflüsse des Bcl-2's handelt.

## **6. Mechanismus und Hemmung der Calcineurin-bedingten Apoptose**

Obwohl Calcineurin ursprünglich nur als Regulator der Herzhypertrophie diskutiert wurde<sup>106,108</sup>, weisen immer mehr Publikationen auf eine wichtige Rolle der Phosphatase bei der Regulation der Apoptose in Kardiomyozyten. Diese Beobachtung wurde mittlerweile für eine Vielzahl verschiedener Zelltypen beschrieben, wobei die Wissenschaftler sowohl pro- als auch anti-apoptotische Effekte des Enzyms nachweisen konnten<sup>192-194</sup>.

Die gleiche Kontroverse betrifft auch die Herzmuskelzellen. Während Kakita et al.<sup>195</sup> und De Windt et al.<sup>196</sup> von einer Hemmung der Apoptose durch Calcineurin berichten, beweisen die Ergebnisse von Saito et al.<sup>197</sup> und Wang et al.<sup>198</sup> eine gegenteilige Wirkung. In diesem Zusammenhang veröffentlichten Kakita et al.<sup>195</sup>, dass Calcineurin *in vitro* die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierte Apoptose von Rattenkardiomyozyten verhindert. Zum gleichen Ergebnis kamen De Windt et al.<sup>196</sup> bei ihren *in vivo* Versuchen mit transgenen Calcineurin-überexprimierenden Mäusen. Diese Mäuse, die eine aktive Form des Enzyms im Herz exprimierten, zeigten einen signifikant verbesserten Schutz vor der DNA-Fragmentierung.

Im Gegensatz dazu präsentierten Wang et al.<sup>198</sup> einen sehr wirkungsvollen pro-apoptotischen Mechanismus des Calcineurins. Sie erkannten, dass Calcineurin *in vitro* das pro-apoptotische Bcl-2-Familienmitglied BAD dephosphoryliert, gefolgt

von einer Heterodimerisation zwischen Bad und Bcl-2<sup>199</sup>. Durch die Bindung mit dem pro-apoptotischen BAD verliert Bcl-2 seine anti-apoptotische Wirkung, was wiederum zu einem deutlichen Anstieg der Apoptoserate führt. Dabei korreliert die Ca<sup>2+</sup>-induzierte Dephosphorylierung mit der Dissoziation des BAD's vom zytosolischen 14-3-3-Protein. Da diese, immer mit einer Translokation auf die Mitochondrienmembran verbundene, Reaktion Calcineurin-induziert ist, lässt sie sich mit CsA hemmen (Abb. 37).

Diesbezüglich stellten auch Saito et al.<sup>197</sup> in einer kürzlich erschienenen Publikation fest, dass BAD bei der Isoproterenol-induzierten Apoptose dephosphoryliert wird. Außerdem untersuchten sie die intrazelluläre Verteilung von Cytochrom C. Dabei ergab sich einerseits eine signifikante Erhöhung der zytosolischen Cytochrom C-Gesamtmenge in Anwesenheit von Isoproterenol, andererseits konnte die Freisetzung des Proteins mit Hilfe des Calcineurininhibitors CsA reduziert werden. Wahrscheinlich beruht der Übergang des Cytochrom C's auf einer Hemmung des anti-apoptotischen Bcl-2's durch das dephosphorylierte BAD.

In Bezug auf unser Modell weisen die Ergebnisse der Cytochrom C-Western Blots und der TUNEL-Methode auf den von Wang et al. erstmalig beschriebenen Mechanismus. Dementsprechend verhindert die nachgewiesene Blockade der Calcineurinaktivität durch CsA die Freisetzung des Cytochrom C's aus den Mitochondrien, gefolgt von einer Reduktion der Apoptoserate in der behandelte Gruppe. Allerdings wird die Interpretation der Ergebnisse durch die Komplexität des Modells erschwert. Insbesondere der direkte Effekt von CsA auf die PT-Porenöffnung stellt einen weiteren sehr wirkungsvollen Schutz vor der Apoptose dar.

Ein weiterer Hinweis auf die paradox anmutende Wirkung von Calcineurin ergibt sich aus den Beobachtungen von Lotem et al.<sup>200</sup>. Ihre Resultate zeigen, dass Calcineurin in den gleichen Zellen sowohl pro- als auch anti-apoptotisch wirken kann, wobei sich die beiden auslösenden Kaskaden erst nach der Calcineurinaktivierung trennen.

Neben der Aktivierung von BAD durch Calcineurin entdeckten Shibasaki et al.<sup>105</sup> 1997 einen weiteren Zusammenhang zwischen dem Enzym und der Bcl-2-Familie. Sie berichteten, dass Bcl-2, als bekanntestes anti-apoptotisches Mitglied der Familie, *in vitro* eine feste Komplexbindung mit Calcineurin eingeht, wodurch die Phosphatase an die Mitochondrienmembranen gebunden wird. Dabei hemmt Bcl-2 die durch Calcineurinüberexpression ausgelöste Apoptose in transgenen Mäusen<sup>201</sup>.

Allerdings bleibt unklar, in welchem Maße dieser Vorgang in unserem Modell eine Rolle spielt und ob es zu der von Shibasaki et al.<sup>105</sup> gezeigten Hemmung der Komplexbildung durch die Heterodimerisation von Bax und Bcl-2 kommt.

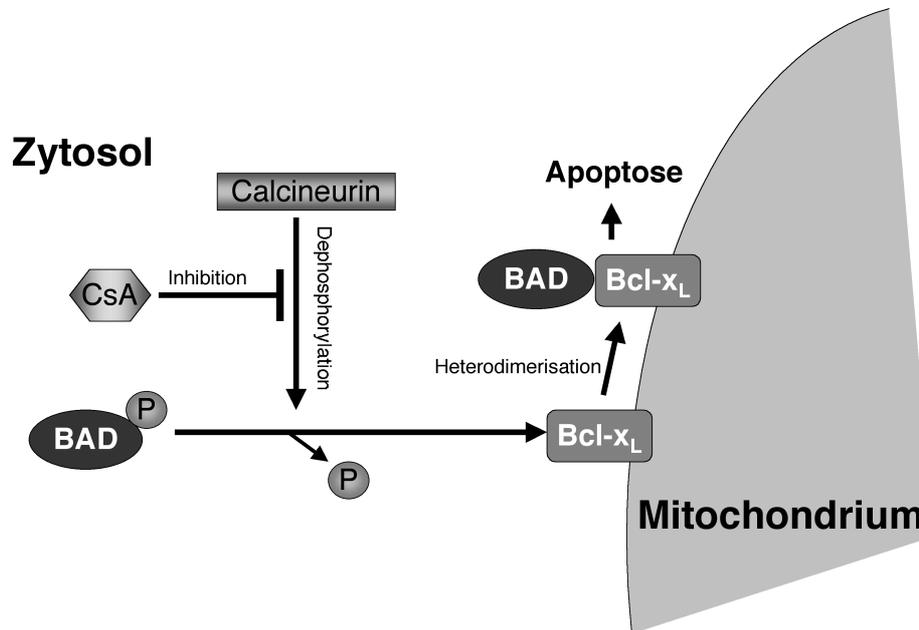


Abb. 37: Modellvorstellung der Calcineurin-induzierten Apoptosekaskade.

## 7. Schlussfolgerung und Zukunftsperspektiven

Zusammenfassend zeigen die Resultate, dass die Kombination aus Hypothermie und Kardioplegie mit CsA-angereicherter UW-Lösung zu einer signifikanten Verbesserung der Ischämietoleranz global ischämischer Herzen führt. Dabei ermöglicht die CsA-induzierte Hemmung der mitochondrialen PT-Pore die vollständige funktionelle Erholung nach 18stündiger Ischämie. Diese Hemmung verhindert einerseits die durch Freisetzung von Cytochrom C und AIF ausgelöste Apoptose, andererseits verringert sie den Grad der ischämischen Schädigung.

Insgesamt deuten die Ergebnisse auf eine mögliche Bedeutung von CsA für humane Herztransplantationen, da diese Eingriffe durch die Dauer der Herzaufbewahrung limitiert werden. Folglich könnte man CsA-perfundierte Spenderherzen über eine viel längere Strecke transportieren, was wiederum zu einer massiven Vergrößerung des Donorpools führen würde. Außerdem wäre eine schnellere funktionelle Erholung nach der Transplantation, sowie eine erhöhte Überlebensrate zu erwarten.

Inwieweit neben der Hemmung der PT-Pore andere Mechanismen an den protektiven Wirkung von CsA beteiligt sind, muss in Zukunft untersucht werden. Dabei muss insbesondere die Bedeutung der nachgewiesenen Calcineurinhemmung

im Hinblick auf die Regulation der Apoptose erforscht werden. Unabhängig davon weist die Veröffentlichung von Massoudy et al.<sup>202</sup> auf einen alternativen kardioprotektiven Mechanismus. Sie berichten, dass CsA in Meerschweinchenherzen die Freisetzung von NO stimuliert, gefolgt von einer Hemmung der Caspasenkaskade<sup>152</sup>. Allerdings ist nicht bekannt, ob dieser Mechanismus auch bei Hunden und Menschen vorkommt.

Dementsprechend sind eine Vielzahl weiterer Versuche notwendig, bevor die Substanz endgültig eingesetzt werden kann. In diesem Zusammenhang sind vor allem die Kombination von CsA mit anderen kardioplegischen Lösungen und der Einsatz anderer Versuchstierspezies von großer Bedeutung. Ein weiterer Ansatzpunkt ergibt sich aus der häufigen Anwendung von CsA bei der Immunsuppression nach Herztransplantationen. Hierbei könnte die genaue Beurteilung der Krankenakten wichtige Hinweise auf die protektive Wirkung von CsA geben. Allerdings ist dabei zu beachten, dass die Behandlungen nicht unter standardisierten Bedingungen durchgeführt wurden.



## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es die protektive Wirkung, sowie die dazugehörigen Wirkungsmechanismen von Cyclosporin A (CsA) an einem Langzeitischämie-Modell beim Hund zu untersuchen. Hierzu wurden zwölf Spenderherzen während einer 18stündigen globalen Ischämie unter hypothermen Bedingungen mit „University of Wisconsin“(UW)-Lösung perfundiert und anschließend 6 Stunden von einem Empfängertier reperfundiert. Dabei wurden sechs Herzen mit CsA ( $10^{-5}$  mol/l) behandelt, während die unbehandelten Organe als Kontrolle dienten. Die vor (A) und nach (B) der Ischämie sowie nach zwei (C) bzw. sechs (D) Stunden Reperfusion entnommenen Biopsien wurden anschließend histologisch untersucht.

Außerdem wurden im Verlauf der Reperfusionsphase stündlich Funktionsparameter bestimmt, deren Auswertung die protektive Wirkung von CsA zeigte. Während sich die kontraktile Funktion in der behandelten Gruppe vollständig erholte, erreichte die endsystolische Elastizität der unbehandelten Herzen nur 50% der Kontrollwerte.

Im zweiten Teil der Studie sollten die möglichen Ursachen für die protektiven Effekte von CsA erforscht werden, wobei sich folgende Resultate ergaben:

Im Elektronenmikroskop zeigten die meisten Präparate nach der 18stündigen Ischämie eine reversible Schädigung. Allerdings war der Schädigungsgrad in den mit CsA perfundierten Herzen weitaus geringer.

Weiterhin wurde in keinem der Präparate elektronenmikroskopische Anzeichen nekrotischer Zellen gefunden. Dafür spricht auch die fehlende Markierung nach der Complement C9 Färbung.

Im Gegensatz dazu stieg der mittels TUNEL-Methode bestimmte Anteil an apoptotischen Zellen zum Ende der Reperfusion signifikant auf 5,9% in der unbehandelten Gruppe. Diese Apoptoserate wurde durch die Gabe von CsA um mehr als 50% auf 2,4% gesenkt. Im weiteren Verlauf wurden die Ergebnisse der TUNEL-Methode durch die Resultate der Lamin B1-Färbung bestätigt. Während die Reduktion von Lamin B1-positiven Kernen in der D-Biopsie der CsA-freien Gruppe 93% betrug, fiel der Anteil in der CsA-Gruppe auf 97%. Die gleiche Tendenz ergab sich aus der Lamin A-Färbung, wobei der Anteil an negativen Kernen nach 6stündiger Reperfusion bei 27% (ohne CsA) bzw. 5% (mit CsA) lag.

Um die genauen Mechanismen der Protektion zu erforschen, wurden verschiedene Proteine mittels der Western Blot-Technik ausgewertet. Dabei ergab insbesondere die quantitative Auswertung des mitochondrialen Cytochrom C-Gehaltes zum Ende der Ischämie einen signifikanten Unterschied. Während das partikuläre Cytochrom C in den mit CsA perfundierten Herzen nur auf 73% der Ausgangsmenge fiel, verringerte sich der Gehalt ohne CsA auf 48%. Dagegen reduzierte sich der

Gehalt an Bax-Protein erst nach 6 Stunden Reperfusion auf 65% (ohne CsA) bzw. 71% (mit CsA). Gleiches galt für das Bcl-2-Protein, wobei die Gesamtmenge nach der Ischämie leicht anstieg, bevor der Gehalt zum Ende der Reperfusion auf 70% ohne und 81% mit CsA abfiel.

Entsprechend verringerte sich die Gesamtmenge an Calcineurin nach 6stündiger Reperfusion auf 64% (ohne CsA) bzw. 72% (mit CsA) der Ausgangsmenge.

Allerdings führte die Perfusion der Herzen mit CsA zu einer vollständigen Hemmung der Calcineurinaktivität während der Ischämie und der Reperfusion, während die Enzymaktivität ohne die Behandlung mit CsA erst nach 6 Stunden Reperfusion auf 70% der Ausgangsaktivität fiel.

In Bezug auf alpha-Aktinin und Aktin konnten im Western Blot keine Mengenunterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten festgestellt werden. Hingegen zeigte die immunhistochemische alpha-Aktinin-Markierung in den C- und D-Biopsien beider Gruppen offensichtliche Veränderungen, die sich als Areale mit aufgelöster und diffuser Querstreifung darstellten.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse eine deutliche protektive Wirkung von CsA, die in Kombination mit Hypothermie und UW-Lösung zu einer drastischen Verbesserung der funktionellen und strukturellen Erholung nach Langzeitischämie und Reperfusion führt.

Dabei verringert CsA einerseits die in der CsA-freien Gruppe auftretenden ischämischen Beschädigungen, andererseits reduziert CsA signifikant die im Verlauf der Ischämie eingeleitete Apoptose.

Beide Effekte werden maßgeblich durch die CsA-bedingte Hemmung der  $Ca^{2+}$ -abhängigen mitochondrialen „permeability transition“-Pore verursacht. Dadurch verhindert CsA die Schwellung der Mitochondrien und die Freisetzung des Apoptoseinduktors Cytochrom C. Außerdem blockiert CsA die pro-apoptotische Wirkung von Calcineurin durch die vollständige Enzymdeaktivierung.

Als CsA-unabhängig erwiesen sich die Proteine der Bcl-2-Familie. In beiden Versuchsgruppen änderte sich das Konzentrationsverhältnis zwischen den pro- und anti-apoptotischen Mitgliedern der Familie zugunsten des anti-apoptotischen Bcl-2's. Hieraus resultiert vermutlich die geringe Apoptoserate trotz der 18stündigen Ischämie.

Insgesamt deuten die Ergebnisse auf eine herausragende Rolle von CsA bei der Entwicklung neuer kardioplegischer Lösungen für die Herzaufbewahrung bei humanen Transplantationen hin, wobei neben der Vergrößerung des Donorpools vor allem die schnellere Erholung des Organs von Bedeutung wäre.

Inwiefern andere Mechanismen (z.B. IAP oder NO) an der Verbesserung der Ischämietoleranz beteiligt sind, muss in zukünftigen Versuchen untersucht werden.

## VII. SUMMARY

Cyclosporine A, an immunosuppressive cyclic undecapeptide initially isolated from *Tolypocladium inflatum gams*, has been widely used for the treatment of allograft rejection.

The aim of the study was to determine a possible protective role against ischemia and to clarify the working mechanisms of cyclosporine A (CsA) in a canine cardiac long-term ischemia model. Therefore twelve dog hearts were perfused with „University of Wisconsin“-solution during 18 hours of hypothermic global ischemia. In six hearts, CsA was added to the cardioplegic solution and the others were used as control. After 18 hours, the hearts were transplanted into the recipient dogs to reestablish blood perfusion. During the following six hours four biopsies were taken: before transplantation (A), at the end of preservation (B), after two hours (C), and after six hours of reperfusion.

Furthermore, the end-systolic elastance was calculated during the reperfusion period to measure functional recovery with the addition of CsA. The function recovered to 55% in the CsA-free group, whereas recovery increased to 100% in CsA-treated hearts.

To further elucidate the cause for these protective effects histomorphological investigations were performed with the following results:

The degree of ischemic damage was determined by electron microscopy. Although most of the hearts showed reversible injury, the degree of damage was elevated in the group without CsA.

Electronmicroscopic evidence for necrosis was not observed. This correlates with the absence of positive complement C9 labeling in all biopsies.

In contrast to necrosis, 6% of the total number of myocytes in the untreated group were apoptotic (TUNEL-positive) after 6 hours of reperfusion. This rate significantly decreased to 2,4% when CsA was added to the cardioplegic solution. These findings were confirmed by Lamin B1-staining where a loss of 7% of Lamin B1 positive nuclei was detected in the D-biopsie of non treated hearts in comparison to 3% in the treated group. Corresponding results were found concerning the number of Lamin A negative nuclei. Their number increased to 27% (without CsA) and to only 5% (with CsA) at the end of the reperfusion period.

To elucidate the working mechanisms of the substance in detail, Western Blot analysis of different proteins was performed. In particular, the quantitative evaluations of mitochondrial cytochrome c showed in a significant difference between both groups. After 18 hours of ischemia, the amount of cytochrome c was

reduced to 48% in CsA-free dogs in comparison to 73% in dogs treated with CsA. In contrast, the total amount of Bax showed no significant changes until the end of the reperfusion period. At this time point, the amount of protein was reduced to 65% (without CsA) and 71% (with CsA), respectively. The same decrease after 6 hours of reperfusion was valid for Calcineurin and Bcl-2, whereby the total quantity of Bcl-2 moderately increased during ischemia before reaching 70% without and 81% with the addition of CsA at the end of reperfusion. Calcineurin decreased from 100% to 64% in the CsA free-group and to 72% in CsA perfused hearts.

Another important finding is the fact, that calcineurin activity was completely blocked during ischemia and reperfusion in the CsA-treated group. In comparison, the activity decreased to 70% at the end of the experiment in untreated hearts.

To study a damaging effect of ischemia/reperfusion on structural proteins Western blot-analysis and histomorphology for alpha-actinin and actin were carried out. No differences were found between the total amount of protein at the four time points but fluorescent labeling of alpha-actinin showed areas with diffuse alpha-actinin labeling in the majority of C- and D-biopsies.

In conclusion, these results demonstrate protective effects of CsA in combination with hypothermia and UW-solution which lead to a drastic increase in functional and structural recovery after longterm ischemia and reperfusion.

Moreover, the addition of CsA diminished on the one hand the degree of ischemic damage as well as significantly reduced the rate of apoptotic cells.

Both mechanisms were caused by stabilization of the mitochondrial permeability transition pore through CsA thereby preventing the mitochondrial swelling and the release of the apoptotic inducer cytochrome c. Furthermore, the CsA-induced blockade of calcineurin activity inhibits the pro-apoptotic effects of calcineurin.

The present results prove that the principal working mechanisms of the Bcl-2-family are independent of CsA. In both groups, the ratio between the pro-apoptotic and anti-apoptotic-members of this family changed towards the anti-apoptotic Bcl-2. This might be the reason for the occurrence of a small number of apoptotic cells after 18 hours of global ischemia.

In summary this data indicates a potential role for CsA in cardioplegic solutions used in transplantation of human hearts. Consequently, the addition of CsA could expand the donorpool and improve the functional recovery after heart transplantations.

## VIII. Abkürzungen

A.	Arteria
ADP	Adenosindiphosphat
AIF	„apoptose-inducing factor“
AMP	Adenosinmonophosphat
Apaf-1	„apoptotic protease activating factor 1“
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BH1-4	Bcl-2 homologe Domäne 1-4
BSA	bovines Serumalbumin
CARD	„caspase-recruiting-domain“
<i>C. elegans</i>	Caenorhabditis elegans
<i>CED</i>	„ <i>C. elegans</i> death domain“
Cn A	Calcineurin A
Cn B	Calcineurin B
CsA	Cyclosporin A
Da	Dalton
DFF	DNA-Fragmentierungs-Faktor
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Ethylene-Glycol-bis-(Aminoethylether)- tetraacetic acid
ESE	endsystolische Elastizität
FADD	„Fas-associated death domain“
IAP	„inhibitors of apoptosis“
I.U.	„international units“
kDa	Kilodalton
KW	Körpergewicht
MBP	Myelin-Basic-Protein
mM	Millimolar (mmol/l)
$\mu$ M	Mikromolar
nmol	Nanomol
MPT	mitochondriale „permeability transition“
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidierte Form)

---

NADH <sub>2</sub>	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduzierte Form)
NF-AT	„nuclear factor of activated T-cell“
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PARP	Polyadenylribosepolymerase
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluoride
PP	Protein-Phosphatase
PTP	„permeability transition“-Pore
RT	Raumtemperatur
Ser	Serin
SEM	Standardfehler
TBS	Tris-Base-Saline
TCA	Tri-Chlor-Säure
TdT	terminale Deoxynucleotidyl-Transferase
TG	Trockengewicht
TNF-alpha	Tumor Nekrose Faktor alpha
TRADD	„TNF-receptor-associated death domain“
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
TUNEL	„terminal-deoxy-nucleotidyl-transferase mediated d-UTP nick-end-labeling
UW	„University of Wisconsin“
UPM	Umdrehungen pro Minute
V.	Vena
-/- Mäuse	„knock out“ Mäuse

## IX. Literaturverzeichnis

1. Carrel A. The surgery of blood vessels. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 1907;18:18.
2. Carrel A, Guthrie CC. The transplantation of veins and organs. *Am. Med.* 1905;10:1101.
3. Mann FC. Transplantation of the intact mammalian heart. *Arch. Surg.* 1933;26:219.
4. Stinson EB, Dong E, Jr., Shumway NE. Experimental and clinical cardiac transplantation. *Postgraduate Medicine.* 1969;46:199-203.
5. Lower RR, Shumway NE. Studies on orthotopic homotransplantation of the canine hearts. *S. Forum.* 1960;11:18.
6. Lower RR, Stofer RC, Shumway. Homovital transplantation of the heart. *J. Thoracic & Cardiovasc. Surg.* 1961;41:196.
7. Barnard CN. The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. *South African Medical Journal.* 1967;41:1271-4.
8. Cheung A, Menkis AH. Cyclosporine heart transplantation. *Transplantation Proceedings.* 1998;30:1881-4.
9. Melrose DG, Dreyer B, Bentall HH. Elective cardiac arrest. *Lancet.* 1955;2:21-22.
10. Schaper J. Die Ultrastruktur des Myokards bei Ischämie. *Habilitationsschrift der medizinischen Fakultät Gießen.* 1980.
11. Thomas FT, Szentpetery SS, Mammana RE, Wolfgang TC, Lower RR. Long-distance transportation of human hearts for transplantation. *Annals of Thoracic Surgery.* 1978;26:344-50.

12. Nazareth W, Yafei N, Crompton M. Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1991;23:1351-4.
13. Griffiths EJ, Halestrap AP. Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1993;25:1461-9.
14. Nutt MP, Fields BL, Sebree LA, Southard JH, Pyzalska D, Pyzalski R, Thomas A, Mentzer RM, Bianco JA. Assessment of function, perfusion, metabolism, and histology in hearts preserved with University of Wisconsin solution. *Circulation*. 1992;86:II333-8.
15. Swanson DK, Pasaoglu I, Berkoff HA, Southard JA, Hegge JO. Improved heart preservation with UW preservation solution. *Journal of Heart Transplantation*. 1988;7:456-67.
16. Jennings RB, Reimer KA, Steenbergen C. Myocardial ischemia revisited. The osmolar load, membrane damage, and reperfusion. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1986;18:769-80.
17. Jennings RB, Ganote CE, Reimer KA. Ischemic tissue injury. *American Journal of Pathology*. 1975;81:179-98.
18. Buja LM. Modulation of the myocardial response to ischemia. *Laboratory Investigation*. 1998;78:1345-73.
19. Theroux P. Protection of the myocardial cell during ischemia. *American Journal of Cardiology*. 1999;83:3G-9G.
20. Reimer KA, Jennings RB. Myocardial ischemia, hypoxia, and infarction. *The Heart and the Cardiovascular System: 2nd edition*. 1991:1875-1973.

21. Kubler W, Spieckermann PG. Regulation of glycolysis in the ischemic and the anoxic myocardium. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1970;1:351-77.
22. Braasch W, Gudbjarnason S, Puri PS, Ravens KG, Bing RJ. Early changes in energy metabolism in the myocardium following acute coronary artery occlusion in anesthetized dogs. *Circulation Research*. 1968;23:429-38.
23. Rovetto MJ, Whitmer JT, Neely JR. Comparison of the effects of anoxia and whole heart ischemia on carbohydrate utilization in isolated working rat hearts. *Circulation Research*. 1973;32:699-711.
24. Neely JR, Liedtke AJ, Whitmer JT, Rovetto MJ. Relationship between coronary flow and adenosine triphosphate production from glycolysis and oxidative metabolism. *Recent Advances in Studies on Cardiac Structure & Metabolism*. 1975;8:301-21.
25. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annual Review of Medicine*. 1991;42:225-46.
26. Jennings RB, Reimer KA, Steenbergen C. Effect of inhibition of the mitochondrial ATPase on net myocardial ATP in total ischemia. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1991;23:1383-95.
27. Hill JL, Gettes LS. Effect of acute coronary artery occlusion on local myocardial extracellular K<sup>+</sup> activity in swine. *Circulation*. 1980;61:768-78.
28. Kleber AG. Resting membrane potential, extracellular potassium activity, and intracellular sodium activity during acute global ischemia in isolated perfused guinea pig hearts. *Circulation Research*. 1983;52:442-50.
29. Steenbergen C, Murphy E, Levy L, London RE. Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. *Circulation Research*. 1987;60:700-7.

30. Tranum-Jensen J, Janse MJ, Fiolet WT, Krieger WJ, D'Alnoncourt CN, Durrer D. Tissue osmolality, cell swelling, and reperfusion in acute regional myocardial ischemia in the isolated porcine heart. *Circulation Research*. 1981;49:364-81.
31. Steenbergen C, Hill ML, Jennings RB. Cytoskeletal damage during myocardial ischemia: changes in vinculin immunofluorescence staining during total in vitro ischemia in canine heart. *Circulation Research*. 1987;60:478-86.
32. Steenbergen C, Hill ML, Jennings RB. Volume regulation and plasma membrane injury in aerobic, anaerobic, and ischemic myocardium in vitro. Effects of osmotic cell swelling on plasma membrane integrity. *Circulation Research*. 1985;57:864-75.
33. Jennings RB, Reimer KA, Kinney RB, Steenbergen C, Sharov VG. Sarcolemmal damage in ischemia. *Myocardial Metabolism: ed*. 1987:120-54.
34. Ganote CE, Vander Heide RS. Cytoskeletal lesions in anoxic myocardial injury. A conventional and high-voltage electron-microscopic and immunofluorescence study. *American Journal of Pathology*. 1987;129:327-44.
35. Buja LM, Miller JC. Relationship of lipid alterations and impaired calcium homeostasis during myocardial ischemia. *Advances in lipobiology: ed*. 1997;2:1-28.
36. Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 1993;117:1208-14.
37. Schaper J. Ultrastructural changes of the myocardium in regional ischaemia and infarction. *European Heart Journal*. 1986;7:3-9.

38. Schaper J, Mulch J, Winkler B, Schaper W. Ultrastructural, functional, and biochemical criteria for estimation of reversibility of ischemic injury: a study on the effects of global ischemia on the isolated dog heart. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1979;11:521-41.
39. Jennings RB, Schaper J, Hill ML, Steenbergen C, Jr., Reimer KA. Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure. *Circulation Research*. 1985;56:262-78.
40. Reimer KA, Hill ML, Jennings RB. Prolonged depletion of ATP and of the adenine nucleotide pool due to delayed resynthesis of adenine nucleotides following reversible myocardial ischemic injury in dogs. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1981;13:229-39.
41. Tani M, Neely JR. Role of intracellular Na<sup>+</sup> in Ca<sup>2+</sup> overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange. *Circulation Research*. 1989;65:1045-56.
42. Whalen DA, Jr., Hamilton DG, Ganote CE, Jennings RB. Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells. I. Effects on cell volume regulation. *American Journal of Pathology*. 1974;74:381-97.
43. Shen AC, Jennings RB. Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury. *American Journal of Pathology*. 1972;67:417-40.
44. Jennings RB. Calcium ions in ischemia. *Calcium Antagonists and Cardiovascular Disease: ed.* 1984:85-95.
45. Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*. 1982;66:1146-9.
46. Bolli R. Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation*. 1990;82:723-38.

47. Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, Lai EK, McCay PB. Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. *Journal of Clinical Investigation*. 1988;82:476-85.
48. Gao WD, Atar D, Backx PH, Marban E. Relationship between intracellular calcium and contractile force in stunned myocardium. Direct evidence for decreased myofilament Ca<sup>2+</sup> responsiveness and altered diastolic function in intact ventricular muscle. *Circulation Research*. 1995;76:1036-48.
49. Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovascular Research*. 1998;38:291-300.
50. Flemming W. Ueber die Bildung von Richtfiguren in Saeugethiereiern beim Uebergang Graaf scher Follikel. *Arch Anat EntwGesch*. 1885:221-244.
51. Kerr JF. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *Journal of Pathology*. 1971;105:13-20.
52. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 1972;26:239-57.
53. Duke RC, Ojcius DM, Ding J. Die Apoptose-Regeln und Fehler beim Zellselbstmord. *Spektrum der Wissenschaft*. 1997:26-35.
54. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*. 2000;45:528-37.
55. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology*. 1992;119:493-501.
56. Sgonc R, Wick G. Methods for the detection of apoptosis. *International Archives of Allergy & Immunology*. 1994;105:327-32.

57. Davies MJ. Apoptosis in cardiovascular disease. *Heart*. 1997;77:498-501.
58. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 1980;284:555-6.
59. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circulation Research*. 1998;82:1111-29.
60. Schaper J, Lorenz-Meyer S, Suzuki K. The role of apoptosis in dilated cardiomyopathy. *Herz*. 1999;24:219-24.
61. Bessis MC. Death of a Cell. In: Swift Motion Picture Laboratories; 1958.
62. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *American Journal of Pathology*. 1995;146:3-15.
63. Lazda EJ, Batchelor WH, Cox PM. Immunohistochemical detection of myocardial necrosis in stillbirth and neonatal death. *Pediatric & Developmental Pathology*. 2000;3:40-7.
64. Robert-Offerman SR, Leers MP, van Suylen RJ, Nap M, Daemen MJ, Theunissen PH. Evaluation of the membrane attack complex of complement for the detection of a recent myocardial infarction in man. *Journal of Pathology*. 2000;191:48-53.
65. Dreyer WJ, Michael LH, Nguyen T, Smith CW, Anderson DC, Entman ML, Rossen RD. Kinetics of C5a release in cardiac lymph of dogs experiencing coronary artery ischemia-reperfusion injury. *Circulation Research*. 1992;71:1518-24.
66. Doran JP, Howie AJ, Townend JN, Bonser RS. Detection of myocardial infarction by immunohistological staining for C9 on formalin fixed, paraffin wax embedded sections. *Journal of Clinical Pathology*. 1996;49:34-7.

67. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*. 1999;13:1899-911.
68. Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology*. 2000;10:369-77.
69. Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes to Cells*. 1998;3:697-707.
70. Goping IS, Gross A, Lavoie JN, Nguyen M, Jemmerson R, Roth K, Korsmeyer SJ, Shore GC. Regulated targeting of BAX to mitochondria. *Journal of Cell Biology*. 1998;143:207-15.
71. Cleary ML, Sklar J. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82:7439-43.
72. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*. 1988;335:440-2.
73. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 1998;281:1322-6.
74. Ito T, Deng X, Carr B, May WS. Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272:11671-3.
75. Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell*. 1993;75:229-40.

76. McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, Nunez G, Jaeger U, McKearn JP, Korsmeyer SJ. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*. 1989;57:79-88.
77. Chinnaiyan AM, Orth K, O'Rourke K, Duan H, Poirier GG, Dixit VM. Molecular ordering of the cell death pathway. Bcl-2 and Bcl-xL function upstream of the CED-3-like apoptotic proteases. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271:4573-6.
78. Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO Journal*. 1998;17:3878-85.
79. Knudson CM, Tung KS, Tourtellotte WG, Brown GA, Korsmeyer SJ. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science*. 1995;270:96-9.
80. Perez GI, Robles R, Knudson CM, Flaws JA, Korsmeyer SJ, Tilly JL. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. *Nature Genetics*. 1999;21:200-3.
81. Skulachev VP. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Letters*. 1998;423:275-80.
82. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 1996;86:147-57.
83. Gonzales DH, Neupert W. Biogenesis of mitochondrial c-type cytochromes. *Journal of Bioenergetics & Biomembranes*. 1990;22:753-68.
84. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997;91:479-89.

85. Li K, Li Y, Shelton JM, Richardson JA, Spencer E, Chen ZJ, Wang X, Williams RS. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell*. 2000;101:389-99.
86. Haworth RA, Hunter DR. Allosteric inhibition of the Ca<sup>2+</sup>-activated hydrophilic channel of the mitochondrial inner membrane by nucleotides. *Journal of Membrane Biology*. 1980;54:231-6.
87. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual Rev. Physiol*. 1998;60:619-42.
88. Halestrap AP. The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury. *Biochemical Society Symposia*. 1999;66:181-203.
89. Duchen MR, McGuinness O, Brown LA, Crompton M. On the involvement of a cyclosporin A sensitive mitochondrial pore in myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular Research*. 1993;27:1790-4.
90. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochemical Journal*. 1999;341:233-49.
91. *Merck Index*. 12th ed; 1996.
92. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents & Actions*. 1976;6:468-75.
93. Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science*. 1984;226:544-7.
94. Ruhlmann A, Nordheim A. Effects of the immunosuppressive drugs CsA and FK506 on intracellular signalling and gene regulation. *Immunobiology*. 1997;198:192-206.

95. Halloran PF, Kung L, Noujaim J. Calcineurin and the biological effect of cyclosporine and tacrolimus. *Transplantation Proceedings*. 1998;30:2167-70.
96. Magee CC, Denton MD, Milford EL. Immunosuppressive agents in organ transplantation. *Hospital Medicine (London)*. 1999;60:364-9.
97. Stewart AA, Ingebritsen TS, Manalan A, Klee CB, Cohen P. Discovery of a Ca<sup>2+</sup>- and calmodulin-dependent protein phosphatase: probable identity with calcineurin (CaM-BP80). *FEBS Letters*. 1982;137:80-4.
98. Klee CB, Crouch TH, Krinks MH. Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76:6270-3.
99. Aramburu J, Rao A, Klee CB. Calcineurin: from structure to function. *Current Topics in Cellular Regulation*. 2000;36:237-95.
100. Kuno T, Takeda T, Hirai M, Ito A, Mukai H, Tanaka C. Evidence for a second isoform of the catalytic subunit of calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin A). *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1989;165:1352-8.
101. Muramatsu T, Kincaid RL. Molecular cloning and chromosomal mapping of the human gene for the testis-specific catalytic subunit of calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin A). *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1992;188:265-71.
102. Ueki K, Muramatsu T, Kincaid RL. Structure and expression of two isoforms of the murine calmodulin-dependent protein phosphatase regulatory subunit (calcineurin B). *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1992;187:537-43.
103. Hemenway CS, Heitman J. Calcineurin. Structure, function, and inhibition. *Cell Biochemistry & Biophysics*. 1999;30:115-51.

104. Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*. 1991;66:807-15.
105. Shibasaki F, Kondo E, Akagi T, McKeon F. Suppression of signalling through transcription factor NF-AT by interactions between calcineurin and Bcl-2. *Nature*. 1997;386:728-31.
106. Molkenkin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. 1998;93:215-28.
107. Zhang W, Kowal RC, Rusnak F, Sikkink RA, Olson EN, Victor RG. Failure of calcineurin inhibitors to prevent pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats. *Circulation Research*. 1999;84:722-8.
108. Ding B, Price RL, Borg TK, Weinberg EO, Halloran PF, Lorell BH. Pressure overload induces severe hypertrophy in mice treated with cyclosporine, an inhibitor of calcineurin. *Circulation Research*. 1999;84:729-34.
109. Jennings RB, Murry CE, Reimer KA. Preconditioning myocardium with ischemia. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1991;5:933-938.
110. Anderson FS, Murphy CE. Isocratic separation of some purine nucleotide, nucleoside, and base metabolites from biological extracts by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr*. 1976;121:251-262.
111. Kostin S, Heling A, Hein S, Scholz D, Klövekorn WP, Schaper J. The protein composition of the normal and diseased cardiac myocyte. *Heart Failure*. 1998;2:245-260.
112. Masters TN, Robicsek F, Schaper J, Jenkins S, Rice H. Effects of canine donor heart preservation temperature on posttransplant left ventricular function and myocardial metabolism. *Transplantation*. 1994;57:807-11.

113. Bigelow WG, Lindsay WK, Greenwood WF. Hypothermia its possible role in cardiac surgery: an investigation of factors governing survival in dogs at low body temperatur. *Annals of surgery*. 1950;132:849-66.
114. Gebhard MM. Myocardial protection and ischemia tolerance of the globally ischemic heart. *Thoracic & Cardiovascular Surgeon*. 1990;38:55-9.
115. Buckberg GD, Brazier JR, Nelson RL, Goldstein SM, McConnell DH, Cooper N. Studies of the effects of hypothermia on regional myocardial blood flow and metabolism during cardiopulmonary bypass. I. The adequately perfused beating, fibrillating, and arrested heart. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 1977;73:87-94.
116. Yamamoto F. Do we need hypothermia in myocardial protection? *Annals of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 2000;6:216-23.
117. Jamieson NV, Sundberg R, Lindell S, Claesson K, Moen J, Vreugdenhil PK, Wight DG, Southard JH, Belzer FO. Preservation of the canine liver for 24-48 hours using simple cold storage with UW solution. *Transplantation*. 1988;46:517-22.
118. Ploeg RJ, Goossens D, McAnulty JF, Southard JH, Belzer FO. Successful 72-hour cold storage of dog kidneys with UW solution. *Transplantation*. 1988;46:191-6.
119. Cleveland JC, Jr., Meldrum DR, Rowland RT, Banerjee A, Harken AH. Optimal myocardial preservation: cooling, cardioplegia, and conditioning. *Annals of Thoracic Surgery*. 1996;61:760-8.
120. Jovanovic A, Lopez JR, Alekseev AE, Shen WK, Terzic A. Adenosine prevents K<sup>+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> loading: insight into cardioprotection during cardioplegia. *Annals of Thoracic Surgery*. 1998;65:586-91.

121. Gevers W. Generation of protons by metabolic processes in heart cells. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1977;9:867-74.
122. Jeevanandam V, Auteri JS, Sanchez JA, Barr ML, Ott GY, Hsu D, Marboe C, Smith CR, Rose EA. Improved heart preservation with University of Wisconsin solution: experimental and preliminary human experience. *Circulation*. 1991;84:III324-8.
123. Ely SW, Mentzer RM, Jr., Lasley RD, Lee BK, Berne RM. Functional and metabolic evidence of enhanced myocardial tolerance to ischemia and reperfusion with adenosine. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 1985;90:549-56.
124. Ip JH, Levin RI. Myocardial preservation during ischemia and reperfusion. *American Heart Journal*. 1988;115:1094-104.
125. Mubagwa K, Mullane K, Flameng W. Role of adenosine in the heart and circulation. *Cardiovascular Research*. 1996;32:797-813.
126. Jennings RB, Ganote CE. Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circulation Research*. 1974;35:156-72.
127. Drinkwater DC, Jr., Ziv ET, Laks H, Lee JR, Bhuta S, Rudis E, Chang P. Extracellular and standard University of Wisconsin solutions provide equivalent preservation of myocardial function. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*. 1995;110:738-45.
128. Bretschneider HJ, Hubner G, Knoll D, Lohr B, Nordbeck H, Spieckermann PG. Myocardial resistance and tolerance to ischemia: physiological and biochemical basis. *Journal of Cardiovascular Surgery*. 1975;16:241-60.

129. Reimer KA, Hill ML, Jennings RB. Prolonged depletion of ATP because of delayed repletion of the adenine nucleotide pool following reversible myocardial ischemic injury in dogs. *Advances in Myocardiology*. 1983;4:395-407.
130. Lee H, Carlson JD, McMahon KK, Moyer TP, Fischer AG. Xanthine oxidase: a source of hydrogen peroxide in bovine thyroid glands. *Life Sciences*. 1977;20:453-8.
131. Gatewood LB, Larson DF, Bowers MC, Bond S, Cardy A, Sethi GK, Copeland JG. A novel mechanism for cyclosporine: inhibition of myocardial ischemia and reperfusion injury in a heterotopic rabbit heart transplant model. *Journal of Heart & Lung Transplantation*. 1996;15:936-47.
132. Jennings RB, Hawkins HK, Lowe JE, Hill ML, Klotman S, Reimer KA. Relation between high energy phosphate and lethal injury in myocardial ischemia in the dog. *American Journal of Pathology*. 1978;92:187-214.
133. Takashi E, Ashraf M. Pathologic assessment of myocardial cell necrosis and apoptosis after ischemia and reperfusion with molecular and morphological markers. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 2000;32:209-24.
134. Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin A, Kostin S, Zimmermann R, Ullmann C, Lorenz-Meyer S, Schaper J. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 2000;32:197-208.
135. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Journal of Experimental Medicine*. 1997;185:1481-6.

136. Linnik MD, Zobrist RH, Hatfield MD. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 1993;24:2002-8; discussion 2008-9.
137. Schumer M, Colombel MC, Sawczuk IS, Gobe G, Connor J, O'Toole KM, Olsson CA, Wise GJ, Buttyan R. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *American Journal of Pathology*. 1992;140:831-8.
138. Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *Journal of Clinical Investigation*. 1994;94:1621-8.
139. Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circulation Research*. 1996;79:949-56.
140. Itoh G, Tamura J, Suzuki M, Suzuki Y, Ikeda H, Koike M, Nomura M, Jie T, Ito K. DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. *American Journal of Pathology*. 1995;146:1325-31.
141. Ohno M, Takemura G, Ohno A, Misao J, Hayakawa Y, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. "Apoptotic" myocytes in infarct area in rabbit hearts may be oncotic myocytes with DNA fragmentation: analysis by immunogold electron microscopy combined with In situ nick end-labeling. *Circulation*. 1998;98:1422-30.
142. Kanoh M, Takemura G, Misao J, Hayakawa Y, Aoyama T, Nishigaki K, Noda T, Fujiwara T, Fukuda K, Minatoguchi S, Fujiwara H. Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair. *Circulation*. 1999;99:2757-64.

143. Oberhammer FA, Hochegger K, Froschl G, Tiefenbacher R, Pavelka M. Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A+B, without enhanced activation of cdc2 kinase. *Journal of Cell Biology*. 1994;126:827-37.
144. Ucker DS, Meyers J, Obermiller PS. Activation-driven T cell death. II. Quantitative differences alone distinguish stimuli triggering nontransformed T cell proliferation or death. *Journal of Immunology*. 1992;149:1583-92.
145. Zhivotovsky B, Gahm A, Orrenius S. Two different proteases are involved in the proteolysis of lamin during apoptosis. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1997;233:96-101.
146. Engler RL, Gottlieb RA. Programmed cell death: apoptosis and cardiovascular disease. *Dialogues in Cardiovascular Medicine*. 1998;3:67-81.
147. Haunstetter A, Izumo S. Future perspectives and potential implications of cardiac myocyte apoptosis. *Cardiovascular Research*. 2000;45:795-801.
148. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circulation Research*. 1979;44:503-12.
149. Suzuki K, Kostin S, Person V, Elsasser A, Schaper J. Time course of the apoptotic cascade and effects of caspase inhibitors in adult rat ventricular cardiomyocytes. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 2001;33:983-94.
150. Gottlieb RA, Engler RL. Apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999;874:412-26.
151. Kliche. Apoptose Mechanismen, Regulation und therapeutische Modulation als klinische Perspektive. *Onkologie*. 1999;5:891-897.

152. Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Apoptosis in relevant clinical situations: contribution of apoptosis in myocardial infarction. *Cardiovascular Research*. 2000;45:630-41.
153. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebbersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999;397:441-6.
154. Piper HM, Sezer O, Schleyer M, Schwartz P, Hutter JF, Spieckermann PG. Development of ischemia-induced damage in defined mitochondrial subpopulations. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1985;17:885-96.
155. Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology Today*. 1997;18:44-51.
156. Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell*. 1997;91:627-37.
157. Attardi G, Schatz G. Biogenesis of mitochondria. *Annual Review of Cell Biology*. 1988;4:289-333.
158. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Zanin C, Vayssiere JL, Petit PX, Kroemer G. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 1995;181:1661-72.
159. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, Susin SA, Petit PX, Mignotte B, Kroemer G. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *Journal of Experimental Medicine*. 1995;182:367-77.

160. Halestrap AP, Davidson AM. Inhibition of Ca<sup>2+</sup>(+)-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochemical Journal*. 1990;268:153-60.
161. Connern CP, Halestrap AP. Purification and N-terminal sequencing of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin. *Biochemical Journal*. 1992;284:381-5.
162. Novgorodov SA, Gudz TI, Jung DW, Brierley GP. The nonspecific inner membrane pore of liver mitochondria: modulation of cyclosporin sensitivity by ADP at carboxyatractyloside-sensitive and insensitive sites. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1991;180:33-8.
163. Petronilli V, Nicolli A, Costantini P, Colonna R, Bernardi P. Regulation of the permeability transition pore, a voltage-dependent mitochondrial channel inhibited by cyclosporin A. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1994;1187:255-9.
164. Crompton M, Ellinger H, Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca<sup>2+</sup>-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochemical Journal*. 1988;255:357-60.
165. Griffiths EJ, Halestrap AP. Further evidence that cyclosporin A protects mitochondria from calcium overload by inhibiting a matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. Implications for the immunosuppressive and toxic effects of cyclosporin. *Biochemical Journal*. 1991;274:611-4.
166. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO Journal*. 1997;16:6914-25.

167. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*. 1997;388:300-4.
168. Lincz LF. Deciphering the apoptotic pathway: all roads lead to death. *Immunology & Cell Biology*. 1998;76:1-19.
169. Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*. 1986;44:817-29.
170. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*. 1993;75:241-51.
171. Jacobson MD, Raff MC. Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature*. 1995;374:814-6.
172. Wu D, Wallen HD, Inohara N, Nunez G. Interaction and regulation of the *Caenorhabditis elegans* death protease CED-3 by CED-4 and CED-9. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272:21449-54.
173. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Lane BR, Dixit VM. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science*. 1997;275:1122-6.
174. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 1997;90:405-13.
175. Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nunez G. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95:4386-91.

176. Conradt B, Horvitz HR. The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell*. 1998;93:519-29.
177. Hengartner MO, Horvitz HR. *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell*. 1994;76:665-76.
178. Kluck RM, Bossy-Wetzell E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 1997;275:1132-6.
179. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*. 1997;275:1129-32.
180. Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Funahashi Y, Mignon A, Lacronique V, Matsuda H, Tsujimoto Y. Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95:1455-9.
181. Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, Tsujimoto Y. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95:14681-6.
182. Pastorino JG, Chen ST, Tafani M, Snyder JW, Farber JL. The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273:7770-5.

183. Eskes R, Antonsson B, Osen-Sand A, Montessuit S, Richter C, Sadoul R, Mazzei G, Nichols A, Martinou JC. Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg<sup>2+</sup> ions. *Journal of Cell Biology*. 1998;143:217-24.
184. Kluck RM, Esposti MD, Perkins G, Renken C, Kuwana T, Bossy-Wetzel E, Goldberg M, Allen T, Barber MJ, Green DR, Newmeyer DD. The proapoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol. *Journal of Cell Biology*. 1999;147:809-22.
185. Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:2225-33.
186. Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettlesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SL, Fesik SW. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*. 1996;381:335-41.
187. Schendel SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M, Reed JC. Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94:5113-8.
188. Schendel SL, Montal M, Reed JC. Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death & Differentiation*. 1998;5:372-80.
189. Schlesinger PH, Gross A, Yin XM, Yamamoto K, Saito M, Waksman G, Korsmeyer SJ. Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94:11357-62.

190. Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermoud JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou JC. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science*. 1997;277:370-2.
191. Sattler M, Liang H, Nettlesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*. 1997;275:983-6.
192. Ankarcrona M, Dypbukt JM, Orrenius S, Nicotera P. Calcineurin and mitochondrial function in glutamate-induced neuronal cell death. *FEBS Letters*. 1996;394:321-4.
193. Tombal B, Weeraratna AT, Denmeade SR, Isaacs JT. Thapsigargin induces a calmodulin/calcineurin-dependent apoptotic cascade responsible for the death of prostatic cancer cells. *Prostate*. 2000;43:303-17.
194. Zhao Y, Tozawa Y, Iseki R, Mukai M, Iwata M. Calcineurin activation protects T cells from glucocorticoid-induced apoptosis. *Journal of Immunology*. 1995;154:6346-54.
195. Kakita T, Hasegawa K, Iwai-Kanai E, Adachi S, Morimoto T, Wada H, Kawamura T, Yanazume T, Sasayama S. Calcineurin Pathway Is Required for Endothelin-1-Mediated Protection Against Oxidant Stress-Induced Apoptosis in Cardiac Myocytes. *Circulation Research*. 2001;88:1239-46.
196. De Windt LJ, Lim HW, Taigen T, Wencker D, Condorelli G, Dorn GW, 2nd, Kitsis RN, Molkentin JD. Calcineurin-mediated hypertrophy protects cardiomyocytes from apoptosis in vitro and in vivo: An apoptosis-independent model of dilated heart failure. *Circulation Research*. 2000;86:255-63.

197. Saito S, Hiroi Y, Zou Y, Aikawa R, Toko H, Shibasaki F, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. beta-Adrenergic pathway induces apoptosis through calcineurin activation in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275:34528-33.
198. Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF, Reed JC. Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science*. 1999;284:339-43.
199. Depre C, Taegtmeyer H. Metabolic aspects of programmed cell survival and cell death in the heart. *Cardiovascular Research*. 2000;45:538-48.
200. Lotem J, Kama R, Sachs L. Suppression or induction of apoptosis by opposing pathways downstream from calcium-activated calcineurin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96:12016-20.
201. Shibasaki F, McKeon F. Calcineurin functions in Ca(2+)-activated cell death in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*. 1995;131:735-43.
202. Massoudy P, Zahler S, Kupatt C, Reder E, Becker BF, Gerlach E. Cardioprotection by cyclosporine A in experimental ischemia and reperfusion-evidence for a nitric oxide-dependent mechanism mediated by endothelin. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1997;29:535-44.

## **X. Danksagung**

Zu guter Letzt will ich mich noch bei allen bedanken, die zu einem erfolgreichen Gelingen der Dissertation beigetragen haben.

Außerdem gilt mein besonderer Dank folgenden Personen:

- Frau Professor Dr. Dr. h.c. Jutta Schaper für die Überlassung des interessanten Themas und herzliche und kompetente Unterstützung während der letzten zwei Jahre
- Frau Professor Dr. M. Kressin für die spontane Bereitschaft, die Arbeit von Seiten des veterinärmedizinischen Fachbereichs der Justus-Liebig-Universität zu betreuen
- Herr Professor Dr. Dr. h.c. Wolfgang Schaper als Direktor des Max-Planck-Instituts für die Genehmigung der zahlreichen Auslandsaufenthalte und Fortbildungen
- Der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaft e.V. für die Bereitstellung der finanziellen Mittel
- Professor Dr. Thomas Masters und den Mitarbeitern der Heinemann Medical Research Laboratories in Charlotte, North Carolina für die intensive Zusammenarbeit in der USA
- Gerhard Stämmler und Gunther Schuster für die freundschaftliche Einführung in die geheime Welt der Apple-Computer
- Beate Grohmann und Brigitte Matzke für die häufige und schnelle Hilfe bei den Arbeiten im Labor und am konfokalen Mikroskop
- Renate Möhren, Annemarie Möbs, Dr. Dimitri Scholz und Dr. Sawa Kostin für die tatkräftige Unterstützung bei der Arbeit am Elektronenmikroskop und dem Anfertigen der Photographien
- außerdem bei allen Mitarbeitern und Doktoranden der Abteilung und des Instituts für die Bereitschaft, mich zu unterstützen und für die hervorragende Teamarbeit in freundschaftlicher Atmosphäre
- den geduldigen Korrektoren Carolin Persdorf und Tonnis Pool
- Silja Lorenz-Meyer für das Vermitteln der Arbeit
- Meinen Eltern für die liebevolle Begleitung in den letzten 27 Jahren und meinen Geschwistern für die vielen schönen Stunden
- Meiner Freundin Carolin Persdorf für die liebevolle und tatkräftige Unterstützung während der letzten Semester und der Dissertation

- Meiner Prüfungsgruppe Uli Bennemann, Tobias Eisenberg und Jens Tschachtschal für die gemeinsam gemeisterten Prüfungen
- Meinem Freundes- und Bekanntenkreis für die fortwährende moralische und soziale Prägung während der letzten Jahre, sowie für die vielen schönen Erinnerungen

Neben diesen Personen möchte ich mich für Gottes Segen bedanken.