

Aus dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Direktor: Prof. Dr. G. Isenberg

**Einfluss von zyklischer mechanischer Dehnung auf den Untergang von
adulten Ventrikelmyozyten in Abhängigkeit vom Alter**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

vorgelegt

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

von Antje Sopart
geboren am 11.03.1977 in Schönebeck/Elbe

Gutachter: Prof. Dr. G. Isenberg
Prof. Dr. J. Holtz
Prof. Dr. H.-G. Zimmer

Datum der Verteidigung: 9.3.2004

urn:nbn:de:gbv:3-000006482

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006482>]

Während des Alterungsprozesses des Herzens kommt es zum Verlust von Myozyten. Der Stellenwert von Nekrose und Apoptose für diese Zelluntergänge war bisher nicht geklärt. Zellverluste erhöhen die mechanische Belastung der überlebenden Myozyten. Hier wird der Einfluss zyklischer mechanischer Dehnung auf Apoptose und Nekrose von kultivierten Ventrikelmyozyten männlicher junger (3 Monate) und alter (14-24 Monate) Ratten analysiert. Die isolierten Myozyten wurden für 24h auf Laminin-beschichteten Bioflex Kulturplatten angeheftet und nachfolgend für 24h zyklisch (1Hz; 5% Elongation; Bioflex System) gedehnt. Die TUNEL-Methode diente zur Bestimmung apoptotischen Zelltods. Nach 48h Kultur (Kontrolle) waren $0,33 \pm 0,12\%$ (MW \pm SD) der Myozyten bei jungen (n=7) und $1,05 \pm 0,35\%$ bei alten Ratten (n=11) apoptotisch. Dehnung steigerte den Anteil apoptotischer Myozyten bei jungen Ratten signifikant, auf $0,58 \pm 0,18\%$, nahm jedoch keinen Einfluss auf die Zahl apoptotischer Myozyten in Zellen aus alten Ratten. Zur Identifizierung nekrotischer Zellen wurden Färbungen zur Darstellung der Zellmembranintaktheit mit Propidiumjodid (PJ) und 5-hexadecanoylaminofluorescein (HEDAF), sowie die Messung der LDH-Aktivität eingesetzt. Dehnung ließ den Anteil nekrotischer Myozyten bei jungen Ratten unbeeinflusst, steigerte aber den Anteil nekrotischer Myozyten bei alten Ratten signifikant. In Myozyten alter Ratten wurden nach Dehnung $38,0 \pm 6,4\%$ (MW \pm SD; n=9) PJ-markierte (Kontrolle $28,2 \pm 6,0\%$) und $50,0 \pm 13,3\%$ HEDAF-markierte (Kontrolle $34,6 \pm 6,5\%$) Myozyten gefunden. Die relative LDH-Aktivität stieg von $5,6 \pm 1,2\%$ auf $8,4 \pm 3,3\%$ (n=9) nach der Dehnung. Bei Myozyten junger Ratten waren $30,7 \pm 10,6\%$ (MW \pm SD; PJ; n=8) bzw. $35,7 \pm 6,5\%$ (HEDAF; n=8) nach 48h Kultur nekrotisch. Die relative LDH-Aktivität betrug $5,6 \pm 1,4\%$. Die Unterschiede zur gedehnten Gruppe waren nicht signifikant. Zyklische mechanische Dehnung kann im Herzen sowohl apoptotischen als auch nekrotischen Zelltod induzieren. Ventrikelmyozyten aus jungen Ratten zeigen ausschließlich dehnungsinduzierten apoptotischen Zelltod, Myozyten aus alten Ratten ausschließlich dehnungsinduzierten nekrotischen Zelltod. Es wird diskutiert, dass Ventrikelmyozyten aus alten Ratten die Fähigkeit verlieren, Signale, die durch Dehnung induziert werden, mit Apoptose zu beantworten. Als mögliche Ursachen werden die im Alter größere Steifheit des Sarkolemmes sowie eine unzureichende ATP-Synthese aufgrund altersbedingter mitochondrialer Dysfunktionen diskutiert.

Sopart, Antje: Einfluss zyklischer mechanischer Dehnung auf den Untergang von adulten Ventrikelmyozyten in Abhängigkeit vom Alter. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 60 Seiten, 2003

Inhalt

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Untergang von Herzmuskelzellen: Apoptose und Nekrose.....	1
1.1.1.	Apoptose: Charakteristika und Signalwege.....	2
1.1.2.	Morphologie und Biochemie des nekrotischen Zelltodes.....	6
1.2.	Bedeutung des Zelltodes für den Herzmuskel.....	7
1.3.	Alter und Tod von Herzmuskelzellen.....	8
1.4.	Mechanische Dehnung und Tod von Herzmuskelzellen.....	10
2.	Zielstellung.....	11
3.	Material und Methoden.....	12
3.1.	Tiere.....	12
3.2.	Isolation und Kultur der Myozyten.....	12
3.3.	Dehnungsapparatur.....	13
3.4.	Nachweis von Apoptose durch terminales Desoxynukleotidyl-Transferase vermitteltes Markieren von DNA-Strangbrüchen mit dUTP (TUNEL).....	15
3.4.1.	Fixierung und Permeabilisierung.....	15
3.4.2.	TUNEL-Reaktion.....	15
3.4.3.	Negativ- und Positivkontrolle.....	16
3.4.4.	Auswertung.....	16
3.5.	Nachweis von Nekrose durch Kernfärbung mit Propidiumjodid (PJ).....	18
3.5.1.	Protokoll zur Färbung mit Propidiumjodid.....	18
3.6.	Nachweis von Nekrose durch Ausschlussfärbung mit 5-hexadecanoyl- aminofluorescein (HEDAF).....	20
3.6.1.	Protokoll zur Färbung mit 5-hexadecanoylaminofluorescein.....	20
3.7.	Nachweis von Nekrose durch Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase (LDH)-Aktivität im Überstand.....	21
3.7.1.	Durchführung.....	22
4.	Ergebnisse.....	23
4.1.	Spontaner nekrotischer Zelltod von kultivierten Kardiomyozyten.....	24
4.2.	Spontaner apoptotischer Zelltod von kultivierten Kardiomyozyten.....	28

4.3.	Einfluss zyklischer mechanischer Dehnung auf den nekrotischen Zelltod....	29
4.3.1.	Nekrotischer Zelltod als Folge mechanischer Dehnung bestimmt mit PJ-Färbung.....	29
4.3.2.	Nekrotischer Zelltod als Folge mechanischer Dehnung bestimmt mit HEDAF-Färbung.....	30
4.3.3.	Nekrotischer Zelltod als Folge mechanischer Dehnung bestimmt durch Messung der LDH-Aktivität im Zellmedium.....	32
4.4.	Einfluss zyklischer mechanischer Dehnung auf den apoptotischen Zelltod..	33
5.	Diskussion.....	35
6.	Zusammenfassung.....	43
7.	Literatur.....	45
8.	Thesen.....	59

Lebenslauf

Selbständigkeitserklärung

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hinweis auf Publikation von Ergebnissen der Dissertation

Danksagung

1. Einleitung

1.1. Untergang von Herzmuskelzellen: Apoptose und Nekrose

Adulte Herzmuskelzellen (Ventrikelmyozyten) sind terminal differenzierte Zellen, die sich nicht mehr teilen können. [53, 89, 105] Ihr Untergang (Tod) kann über den Verlust kontraktiven Materials zum Versagen der Pumpfunktion und damit zum Tod des Menschen führen. [87, 94] Ein Untergang adulter Herzmuskelzellen wird im Verlauf des Alterns [2, 42, 71, 73, 75] und bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz [70, 86, 89, 103] beobachtet.

Ventrikelmyozyten können über zwei Wege untergehen: über den programmierten Zelltod, die Apoptose, oder über den „ungeordneten“ Zelltod, die Nekrose.

Apoptose und Nekrose können im Herzmuskel bzw. in der Zellkultur gleichzeitig vorkommen. [26, 42] Morphologie und Biochemie erlauben, Apoptose und Nekrose voneinander zu unterscheiden.

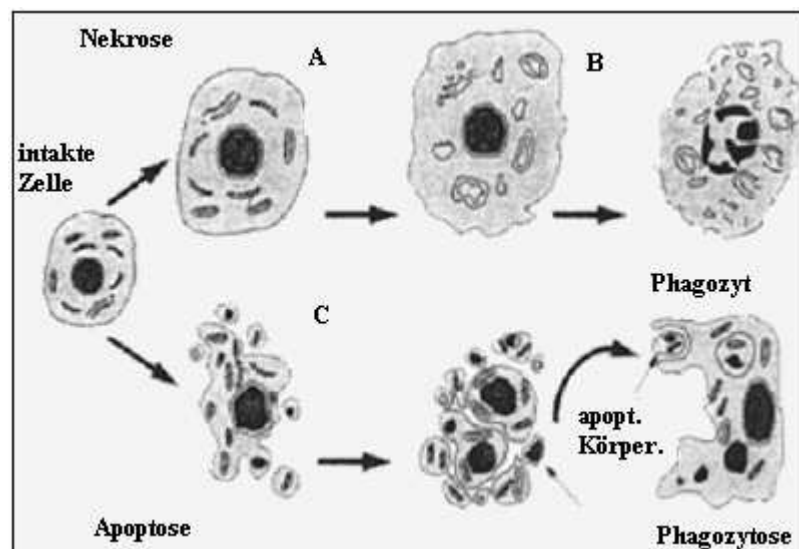


Abb. 1.1. Morphologische Veränderungen bei Nekrose und Apoptose

A. Zellschwellung und Verdickung der Mitochondrien **B.** Ruptur von Zellorganellen und Plasmazellmembran, wahllose Fragmentation der DNA **C.** Schrumpfen der Zelle, Kondensation des Chromatins, Kondensation und Fragmentation des Zellkerns, membrane blebbing, Entstehung apoptotischer Körperchen [22]

Während bei nekrotischem Zelltod mit der Schädigung des Sarkolemmes der sogenannte „point of no return“ erreicht ist, kann in die apoptotische Signalkaskade bis zur Aktivierung von Effektorcaspasen auf vielfältige Art eingegriffen und die Auslösung apoptotischen Zelltodes verhindert werden. Zytosolische apoptotische Veränderungen sind reversibel solange der Kern noch funktionell intakt ist.

1.1.1. Apoptose: Charakteristika und Signalwege

Bei der Apoptose handelt es sich um einen strukturierten, ATP-abhängigen Prozess, der durch externe oder interne Signale induziert wird und danach durch genetisch festgelegte Informationen abläuft.

Morphologisch ist der apoptotische Zelltod von Kardiomyozyten charakterisiert durch das Schrumpfen der Zellen, Auflösung von Zellkontakten, Kondensation und Margination des Chromatins, Kondensation und Fragmentation des Zellkerns, Bildung von Ausstülpungen und Bläschen an der Zytoplasmamembran (membrane blebbing) und darauf folgend der Entstehung membranumschlossener Zellreste, sogenannter apoptotischer Körperchen, in denen die Zellorganellen erhalten bleiben. (Abb. 1.1.) Die Spaltung der DNA erfolgt bei apoptotischem Zelltod charakteristisch zwischen den Nukleosomen, so dass DNA-Fragmente mit einer Größe von ca. 180 Basenpaaren und deren Vielfache entstehen. Einhergehend mit den beschriebenen Veränderungen ist ein Verlust der Membranasymmetrie. Es kommt zur Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche.

Die entstandenen Zellfragmente werden von umliegenden Zellen, meist Makrophagen, phagozytiert, ohne dass eine Entzündungsreaktion nachweisbar wäre. Nach der Phagozytose findet eine vollständige Degradation der apoptotischen Körperchen statt. [44, 65]

Die Auslöser der Signalkaskaden, die zu apoptotischem Zelltod führen, sind vielfältig. Mechanische Dehnung [14], Stickstoffmonoxid [84], Ischämie und Reperfusion [103] und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) [106] konnten als Auslöser von Apoptose in Kardiomyozyten identifiziert werden. Es sind verschiedene Mechanismen für die Weiterleitung des apoptotischen Signals bekannt. Besondere Bedeutung werden dem Weg über Todesrezeptoren oder Death Receptors und dem mitochondrialen Weg beigemessen. Zentraler Bestandteil der apoptotischen Signalkaskaden ist die Aktivierung Aspartat-spezifischer Proteasen, auch Caspasen

genannt. Sie liegen als Zymogene in der Zelle vor und werden durch proteolytische Spaltung aktiviert. Ihre Substrate sind Caspasen selbst und sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Proteine. Die Spaltung der Substrate führt letztlich zu den genannten typischen morphologischen Veränderungen. Die Modulierung der Kaskade erfolgt über intrazelluläre Proteine und Enzyme.

Zur Aktivierung der Caspase-Kaskade über Todesrezeptoren ist die Interaktion des Rezeptor-Ligand-Komplexes mit verschiedenen zytosolischen Proteinen nötig. [1, 8, 15, 67, 77, 98, 112]

Am Anfang der mitochondrialen Signalkaskade steht die Unterbrechung des mitochondrialen Transmembranpotentials. [10] Die erhöhte Membranpermeabilität wird durch Permeabilitätsübergangsporen (PT) verursacht. [66] Mitglieder der Bcl-2 Familie, Caspasen und Erhöhung der mitochondrialen Kalziumkonzentration sind wichtige Faktoren, die die PT Poren aktivieren können. [23, 66, 79] Die Folge ist, dass proapoptische Proteine aus den Mitochondrien freigesetzt werden. Dazu gehören die Caspasen-2 und -9, Cytochrom c und der Apoptosis inducing factor (AIF). [9, 97, 75] Cytochrom c kann auch unabhängig von Änderungen des mitochondrialen Transmembranpotentials in das Zytosol freigesetzt werden. [9, 41, 23]

Cytochrom c ist als Bestandteil der Atmungskette bekannt, spielt aber auch eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Caspase-9 im Zytosol. Cytochrom c und Procaspase-9 fördern die Bindung von Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) und ATP. Es entsteht ein Apaf-1-Cytochrom c-Komplex (Apoptosom), der es vermag, Procaspase-9 zu rekrutieren und zu aktivieren. [40, 116] Die aktive Caspase-9 wird aus dem Komplex freigesetzt. [116] Sie wird für die Aktivierung von Caspase-3 und -7 benötigt. Auf die Aktivierung der Caspase-6 folgt die Aktivierung von Caspase-8 und -10. [97, 116]

Die Wirkung von AIF hingegen ist Caspasen-unabhängig. AIF wird nach Freisetzung aus den Mitochondrien in den Zellkern transloziert und vermag die Kondensation des Chromatins und eine DNA-Fragmentierung auszulösen. [100, 18]

Bei einem intrazellulären Mangel an ATP ist die Zelle nicht mehr in der Lage die apoptotischen Signalkaskaden vollständig zu durchlaufen. [96] Sie geht dann auf dem Weg des nekrotischen Zelltodes zugrunde.

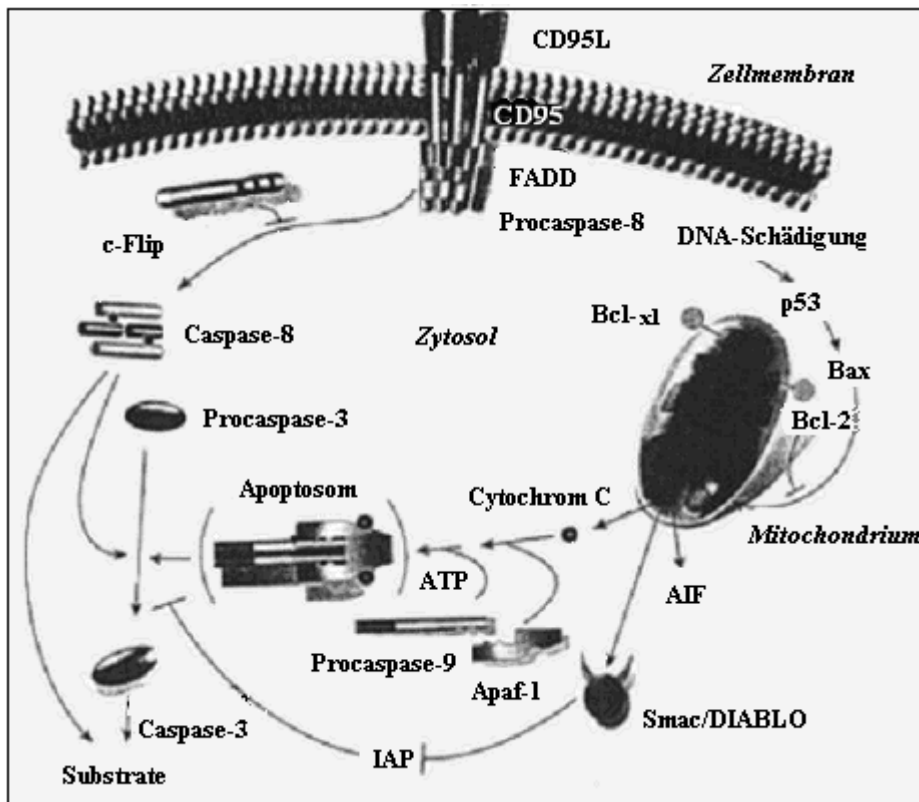


Abb. 1.2. Die apoptotischen Signalkaskaden [32]

Die beschriebenen Signaltransduktionswege können über unterschiedliche Gene und Proteine auf verschiedenen Ebenen reguliert werden. [93, 78, 91, 17, 52]

Von besonderer Bedeutung für die Regulation des mitochondrialen Signaltransduktionswegs sind die Mitglieder der Bcl-2 Familie. Die Bcl-2 Familie kann aufgrund von funktionellen Kriterien in Proteine mit antiapoptotischer (Bcl-2, Bcl-XL) oder proapoptotischer (Bax) Wirkung eingeteilt werden. [47, 66, 79] Die Mitglieder der beiden Gruppen können Homo- und Heterodimere bilden. Vermutlich ist die Wirkung der Mitglieder der Bcl-2 Familie davon abhängig, wieviel des jeweiligen Proteins nicht als Heterodimer vorliegt. [76, 116] Das Verhältnis der verschiedenen Proteine zueinander entscheidet über Hemmung oder Förderung von apoptotischen Prozessen. [52]

Auch die Transkription der Mitglieder der Bcl-2 Familie scheint durch andere Mitglieder der Familie beeinflusst werden zu können. So wurde in neonatalen Rattenkardiomyozyten beobachtet, dass nach Apoptoseinduktion in Anwesenheit von Bcl-2 die Transkription des Bax-Promotors deutlich niedriger war als ohne Bcl-2. [47]

Die Mitglieder der Bcl-2 Familie regulieren die mitochondriale Permeabilitätstransition. [66, 23] Induktion von Bax führt zur Abnahme des mitochondrialen Transmembranpotentials und zu apoptotischem Zelltod. [79] Dabei wurde auch die Freisetzung proapoptotischer Faktoren z.B. Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytoplasma beobachtet. [79, 41] Dem entsprechend ist gezeigt worden, dass Überexpression von Bcl-2 oder Bcl-XL die Freisetzung von Proteinen, wie Cytochrom c, aus den Mitochondrien verhindern kann. [110, 48, 41]

Außerdem wird vermutet, dass Bax auch direkt, ohne Änderung der mitochondrialen Membranpermeabilität, die Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien induzieren kann. [41]

In direktem Zusammenhang mit Apoptose steht auch das Tumorsuppressorgen p53. p53-abhängige Transkription wird bei verschiedenen Genen beobachtet. Es wurde berichtet, dass p53 an die Promotorregion von Angiotensinogen, AT1 Rezeptor und Bax bindet. [54, 47] Die Bindung von Angiotensin II an AT1 löst Apoptose aus. [43, 57] Vermutlich kann p53 den apoptotischen Prozess transkriptionsabhängig und -unabhängig aktivieren. [20]

Weiterhin wird von Cytochrom c-unabhängiger Induktion von Apoptose durch p53-abhängige Erhöhung von reaktiven Sauerstoffspezies und damit Senkung des mitochondrialen Membranpotentials berichtet. [59] p53 wird durch den Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) gehemmt. [56] In Anwesenheit von IGF-1 wurde im Tierversuch auch ein Anstieg von antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie und eine Verminderung proapoptotischer Proteine dieser Familie beobachtet. [109] IGF-1 hemmte die Induktion von Bax und die Aktivierung von Caspase-3. [109] Überexpression von IGF-1 verhinderte die Aktivierung von Zelltod. [60]

Weitere Kontrollmechanismen der apoptotischen Signalkaskade setzen auf der Ebene der Caspase-Kaskade ein. Es sind verschiedene Moleküle bekannt, die als Inhibitoren für Caspasen wirken. Dazu gehören unter anderem Mitglieder der IAP (Inhibitor of apoptosis) Familie, wie c-IAP-1 und c-IAP-2. [111, 88]

Auch die Aktivierung von Mitgliedern der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Familie kann in Kardiomyozyten zu apoptotischem Zelltod führen. Zellulärer Stress kann bestimmte Mitglieder der MAPK-Familie aktivieren. [49, 7, 3] Extrazellulär regulierte Kinase (ERK), c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und p38-MAPK werden bei Stress aktiviert. [7, 16] Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK) sind in Kardiomyozyten an der Entstehung von Apoptose beteiligt. [7, 3] Aktivierung von JNK bei oxidativem Stress führte zu Freisetzung von Cytochrom c

aus den Mitochondrien und zur Auslösung von programmiertem Zelltod. [3, 113] Die Aktivierung von p38 kann scheinbar ebenso Apoptose induzieren. [113] Phosphorylierung von p38 MAPK führt aber auch zur Aktivierung von MAPK-aktivierter Proteinkinase 2 (MAPKAPK2), die dann das Hitzeschockprotein 25/27 (HSP25/27) phosphoryliert. [16] Dies wirkt sich schützend auf das Aktin des Zytoskeletts aus. [25] ERK Aktivierung führt wahrscheinlich auch zu Inhibition von Apoptose. [112]

1.1.2. Morphologie und Biochemie des nekrotischen Zelltodes

Nekrotischer Zelltod ist ein pathologischer Vorgang, der als Folge von Gewebsverletzungen, Gifteinwirkung oder Nährstoffmangel auftreten kann. [24, 94] Anoxie, z.B. nach Koronararterienverschluss, führt durch das Fehlen der mitochondrialen Energiegewinnung zu ATP-Depletion. [24, 94] Das Defizit an ATP hat zur Folge, dass die Pumpfunktion der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ und $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ eingeschränkt und schließlich ganz aufgehoben wird. [24] Eine anhaltende Überladung des Zytosols und der Zellorganellen mit hohen Ca^{2+} -Konzentrationen kann zur Zellschädigung führen. Zu den zellschädigenden Mechanismen gehört die Veränderung des Phosphorylierungszustandes von Strukturproteinen und damit einhergehend eine Störung der zytoskeletalen Stabilität. [5, 4] In Myozyten kommt es durch anhaltend erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_c$ außerdem zu einer Aktivierung des kontraktile Apparates. Es entwickelt sich ein Rigor, der die Zellstruktur mechanisch zerstört. [85, 30, 80] Bei Schäden der Zellmembran und fehlender $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -Funktion kommt es intrazellulär zur Ansammlung von Ionen und zu osmotisch bedingtem Flüssigkeitseinstrom. Die Zelle schwillt an. Es treten die charakteristischen Zeichen von nekrotischem Zelltod auf. [24] Dazu gehören Kondensation der Kernsubstanz, eine wahllose Fragmentation der DNA durch Endo- und Exonucleasen und die Ruptur von sowohl Zellorganellen als auch der Plasmazellmembran. Durch das Zerreißen der Plasmazellmembran kommt es zum Austritt von zytoplasmatischen Bestandteilen, welche die Entzündungsreaktion bedingen. [81, 87]

ATP-Mangel kann auch durch Aktivierung von Reparaturprozessen nach Zellschädigung hervorgerufen werden. Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) ist ein nukleäres Enzym, welches durch DNA-Strangbrüche aktiviert wird und an der

physiologischen DNA-Reparatur beteiligt ist. [19] Überaktivierung von PARP kann durch Aufbrauchen von benötigtem ATP zu nekrotischem Zelltod führen. [27, 33]

Es konnte gezeigt werden, dass in Kardiomyozyten neben der Menge intrazellulären ATPs auch Intensität und Dauer eines Reizes über den Modus des Zellularuntergangs entscheiden können. [96, 104] In neonatalen Rattenkardiomyozyten führte 24h Exposition mit NO-Donatoren in Konzentrationen von 10 und 100 μ M zu apoptotischem Zelltod. Konzentrationen von 1mM induzierten sowohl Apoptose als auch Nekrose, wobei nach 2h Inkubation apoptotischer Zelltod vorherrschte, danach das Ausmaß nekrotischen Zelltods deutlich zunahm. [104]

1.2. Bedeutung des Zelltods für den Herzmuskel

Der Untergang von adulten Herzmuskelzellen wird im Verlauf des Alterns [42, 73, 71, 2, 75] und bei verschiedenen Kardiomyopathien [89, 103, 86, 70] beobachtet. Im linken Ventrikel junger Ratten (3 Monate) wurden 0,001% apoptotische Myozyten identifiziert. Der Anteil nekrotischer Myozyten war 7-fach größer. Bei 24-monatigen Ratten fand man 0,0086% apoptotische Myozyten. Der Anteil nekrotischer Myozyten war 16-fach größer. [42] Andere Studien berichten über apoptotischen Zelltod im Rattenmyokard von zwischen 0,0008 und 2,33%, im menschlichen Myokard von 0,007%. [82, 54, 55, 89]

Die Angaben über das Ausmaß von Zellularuntergängen unter verschiedenen pathologischen Bedingungen schwanken stärker. Übereinstimmung herrscht meist über die Verteilung der apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen. Beim Myokardinfarkt kommt es durch Störung der Perfusion und ATP-Mangel zu zentralen Nekrosen. Die veröffentlichten Zahlen über apoptotischen Zelltod bei Myokardinfarkten schwanken zwischen 0,8% und 12% in den direkt an den Infarkt angrenzenden Regionen, in weiter vom Infarkt entfernten Gebieten zwischen 0 und 1%. [89, 74] Unter den meisten pathologischen Bedingungen ist das Ausmaß des nekrotischen Zelltodes deutlich größer als das des apoptotischen. [26, 103]

Solche Verluste von Herzmuskelzellen können nicht durch mitotische Teilung repariert werden. Kommt es zu einem Verlust von Zellen steigt die Kraft, die während der Systole pro Flächeneinheit des Wandquerschnitts (Wandspannung) aufgebracht werden muss. Von den verbliebenen Zellen wird eine erhöhte Kraft gefordert. Dies führt zur Hypertrophie der Zellen. [2, 75, 73, 42]

1.3. Alter und Tod von Herzmuskelzellen

Der Beitrag des Alterns für die Entstehung myokardialer Dysfunktionen wird vornehmlich auf den Verlust von kontraktiven Ventrikelmyozyten (systolische Dysfunktion) und auf eine erhöhte Steifigkeit des Herzens durch Fibrosierung (diastolische Dysfunktion) zurückgeführt. [11, 42, 71, 73, 2, 75]

Der Verlust von Kardiomyozyten bei zunehmendem Alter wurde in verschiedenen Studien bei Mensch und Tier beschrieben. [42, 71, 73, 2, 75] Bei Ratten wurde zwischen einer Gruppe von 10-12-monatigen und einer Gruppe von 19-21-monatigen Tieren ein Verlust von 18% der Myozyten des linken Ventrikels beobachtet. [2] Im humanen Myokard wurde ein Verlust von 52 Millionen Myozytenzellkernen [73] bzw. 64 Millionen Zellen pro Jahr [75] beobachtet. In beiden Studien war das gesamte Herz vom Zellverlust betroffen. Sowohl im Rattenmyokard als auch im menschlichen Myokard ging der Zellverlust mit einer ausgeprägten Hypertrophie der verbliebenen Zellen einher. [2, 75, 73] In Rattenherzen wurde gezeigt, dass der altersbedingte Verlust von Myozyten durch nekrotischen und apoptotischen Zelltod verursacht wurde. Folgen des Verlustes von Myozyten und der Hypertrophie der verbliebenen Zellen war in dieser Studie das Auftreten ventrikulärer Dysfunktionen. [42]

Die existierenden Theorien für die Entstehung des Alterns von Organismen sind vielfältig. Übereinstimmung herrscht darüber, dass Altern multifaktoriell verursacht wird. [69] Es sind verschiedene Veränderungen im Verlauf des Alterungsprozesses zu beobachten, die Ursache für einen altersbedingten Zellverlust sein können. Besondere Bedeutung wird dabei der veränderten Funktion der Mitochondrien und der Wirkung von oxidativem Stress beigemessen. [31, 29]

Mit zunehmendem Alter steigt die Produktion von Oxidantien in Kardiomyozyten. [30] Oxidativer Stress kann Zelluntergänge direkt induzieren. [106] Exposition mit Oxidantien kann außerdem zu Schäden der mitochondrialen DNA (mtDNA) führen. Durch das Fehlen von Histonen und die Nähe zu den Produktionsstätten von ROS ist die mtDNA für Schäden durch chronische Exposition mit Oxidantien besonders gefährdet. [34, 72, 13] Als Folge kann es zu Dysfunktionen der Mitochondrien kommen, die wiederum zu einer erhöhten Produktion von ROS führen. [22, 29, 28] Die erhöhte Produktion von Oxidantien ist Folge von altersbedingten Änderungen im Ablauf der oxidativen Phosphorylierung. Mit zunehmendem Alter verschlechtert sich die energetische Kopplung von Elektronentransportkette und ATP-Synthese. Es kommt zu erhöhter Produktion von Oxidantien und Beeinträchtigung der ATP-

Synthese. [28, 29] Zusätzlich wird vermutet, dass es mit zunehmendem Alter zu Aktivitätsminderungen der, an der mitochondrialen Atmungskette beteiligten Proteinkomplexe kommt. Angaben in der Literatur diesbezüglich sind jedoch widersprüchlich. [67, 102, 31]

Mit zunehmendem Alter werden Veränderungen in der Konzentration verschiedener, mit dem Zelltod assoziierter, Proteine beobachtet. Gefunden wurde eine Erhöhung der zytosolischen Cytochrom c Konzentration und eine Verminderung der Konzentration von antiapoptotischem Bcl-2. [82] Die Konzentration von proapoptotischem Bax zeigt keine altersbedingten Veränderungen. [82] Es liegen auch Untersuchungen vor, die keine altersbedingte Veränderung der Expression und Verteilung von Bcl-2 finden konnten. [71] Trotzdem ist nicht auszuschließen, dass Veränderungen der Konzentration von Mitgliedern der Bcl-2 Familie vorliegen. Altersabhängige Reaktionen anderer, den apoptotischen Prozess regulierender Gene, konnten nach hämodynamischer Entlastung des Myokards bei Patienten mit Herzversagen gezeigt werden. Mit abnehmendem Patientenalter nahm dabei die Expression der antiapoptotischen Gene hIAP-1, hIAP-2 und FLIP nach Entlastung zu. [92]

Weiterhin wurde gezeigt, dass die Expression von AT1 und AT2 mit zunehmendem Alter steigt. Hier wird vermutet, dass die Expression von AT1 Folge von hämodynamischen Veränderungen sein könnte. [34] Andere Studien zeigen eine Erhöhung der diastolischen bzw. Senkung der systolischen Kalzium-Konzentration in Abhängigkeit vom Alter. [71]

Weitere Faktoren, die als Ursache altersbedingter Veränderungen in Erwägung gezogen wurden, zeigten keine Änderungen in Abhängigkeit vom Alter. Dazu gehören die Konzentration von p53, Bax, die Aktivität von Apaf-1 und Caspase-3 sowie der intrazelluläre pH-Wert und die pH-abhängige DNase II. [82, 71]

Neben den beschriebenen Veränderungen ist eine alters- aber auch ernährungsabhängige Veränderung der Lipidzusammensetzung der Mitochondrienmembran und damit einhergehend eine Verminderung der Fluidität derselben beschrieben worden. [50] Eine ähnliche Veränderung der Lipidzusammensetzung ist auch an der Plasmazellmembran zu beobachten. Der Anteil ungesättigter Fettsäuren sinkt, die Rigidität der Membran nimmt zu. [63]

1.4. Mechanische Dehnung und Tod von Herzmuskelzellen

Bekannt ist, dass mechanische Dehnung apoptotischen Zelltod induzieren kann. Bei *in vitro* Untersuchungen an Ventrikelmyozyten von 3 Monate alten Ratten wurde nach einer 24-stündigen Dehnung (9%) ein 7,6-facher Anstieg der Apoptose auf $17,6 \pm 4\%$ beobachtet. Die ungedehnte Kontrollgruppe wies $2,33 \pm 0,55\%$ auf. [54] Untersuchungen an Kardiomyozyten neonataler Ratten zeigte eine Induktion von Apoptose nur bei Dehnung mit hoher (25%) nicht aber bei Dehnung mit niedriger (5%) Amplitude. [83] Bei Überdehnung von Papillarmuskeln wurden apoptotische Zelluntergänge einhergehend mit einer Verschlechterung der mechanischen Leistung beobachtet. [14]

Die Mechanismen, die zu dehnungsinduziertem Zelltod führen, sind noch nicht vollständig geklärt. Bekannt ist, dass mechanische Dehnung die Expression von Genen und die Synthese von Proteinen induziert, Proteinkinasen aktiviert und zu einer Erhöhung der Produktion von Sauerstoffradikalen führt. [14, 54, 83]

Mechanische Dehnung ändert auch die elektrophysiologischen Gegebenheiten des Herzens. Ursache dieses als mechano-elektrische Kopplung bekannten Systems sind dehnungsaktivierte Kanäle (stretch-activated channels, SACs). Mechanische Stimuli modulieren Ionenströme. In Ventrikelmyozyten wurde ein dehnungsinduzierter Ionenstrom durch nichtselektive Kationenkanäle beobachtet. Es kommt zu einer dehnungsinduzierten Steigerung der intrazellulären Na^+ - und Ca^{2+} -Konzentration. [36, 114]

Bei Überlastung des Myokards ist weiterhin gezeigt worden, dass apoptotische Prozesse durch Stress-empfindliche Signalvermittlungswege ausgelöst werden können. Mechanische Dehnung kann in kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten SAPK/JNK aktivieren. Die Aktivierung war proportional zur Dehnung und unabhängig von der Sekretion von Angiotensin II, ging jedoch mit einer erhöhten Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 einher. [49]

Während verschiedene Studien über dehnungsinduzierte Apoptose vorliegen, sind Veröffentlichungen über nekrotischen Zelltod als Folge von mechanischer Dehnung nicht vorhanden.

2. Zielstellung

Während des Alterungsprozesses des Herzens bei Menschen und Tieren kommt es zu einem Verlust von Myozyten. [42, 73] Der Stellenwert des nekrotischen und apoptotischen Weges für diese Zellverluste war bisher nicht geklärt. Die vorgelegte Arbeit soll helfen, diese Frage zu beantworten.

Zelluntergang im Alter erhöht die mechanische Belastung der überlebenden Myozyten. [87, 94] Bekannt war, dass mechanische Dehnung in Kardiomyozyten von Ratten Apoptose induzieren kann. [14, 54] Deshalb wird hier der Einfluss mechanischer Dehnung auf Apoptose und Nekrose an Myozyten aus jungen und alten Ratten analysiert.

Da kardio-vaskuläre Erkrankungen die häufigsten Todesursachen alter Menschen darstellen [87], sollten die erhofften Ergebnisse dieser Arbeit über mechanisch-induzierte Apoptose und Nekrose in Abhängigkeit vom Alter zur Ursachenforschung beitragen.

3. Material und Methoden

3.1. Tiere

Für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden Ventrikelmyozyten aus Herzen alter und junger Ratten verwendet. Es wurden nur Myozyten aus Herzen männlicher Tiere untersucht, um geschlechtsbedingte Einflüsse ausschließen zu können. [26] Bei den jungen Tieren handelte es sich um Wistar-Hannover-, bei den alten Tieren sowohl um Wistar-Hannover- als auch Wistar-Kyoto-Ratten. Die Ergebnisse der beiden Gruppen der alten Tiere wurden zusammengefasst, da sich für die durchgeführten Experimente keine Unterschiede ergaben. Während sich Tibiallänge, Körper- und Herzgewicht mit zunehmendem Alter signifikant erhöhten, blieb das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht unverändert. Es lag keine altersbedingte Entwicklung einer Herzhypertrophie vor.

	Jung (3 Mon.)	Alt (14-24 Mon.)
Tibiallänge	40,0±1,4mm	45,3±3,0mm *
Körpergewicht	342±34g	466±89g **
Herzgewicht	1,5±0,2g	2,0±0,2g **
Herzgewicht (mg)/ Körpergewicht (g)	4,5±0,7	4,4±1,0

* p<0,05; ** p<0,0001

Tab. 3.1. Tibialängen, Herz- und Körpergewichte der untersuchten Altersgruppen

3.2. Isolation und Kultur der Myozyten

Die Ventrikelmyozyten wurden aus Herzen alter und junger Ratten durch retrograde Perfusion mit kollagenasehaltiger Ca²⁺-freier Tyrode-Lösung (Tyrode: 150mM NaCl, 5,4mM KCl, 1,2mM MgCl₂, 20mM Glucose, 5mM HEPES; pH 7,4; 37°C) isoliert. Nach der Perfusion wurden die Zellen für 2-3h in kaltem KB-Medium (70mM KOH,

40mM KCl, 50mM L-Glutaminsäure, 20mM Taurin, 20mM KH₂PO₄, 3mM MgCl₂, 10mM Glucose, 5mM Na-Pyruvat, 0,5mM EGTA, titriert mit KOH auf pH 7,4) inkubiert. [38] Von den abgesetzten Zellen wurde dann der Überstand entfernt. Die Zellen wurden in das Zellkulturmedium M199 (Earle's salts), das 1% Penicillin/Streptomycin (Sigma), 10µg/ml Amikacin (Sigma) und 10µg/ml Amphotericin B enthielt, resuspendiert und auf mit 20µg/ml Laminin beschichtete Kulturschalen überführt. Zu diesem Zeitpunkt wiesen über 60% der Zellen eine intakte Zellmembran auf. (Abb. 4.1.) Zum Anheften wurden die Myozyten für 24h mit dem Zellkulturmedium im Brutschrank (5% CO₂, 37°C) kultiviert. Nach 24h erfolgte ein Mediumwechsel. Dabei wurden nicht angeheftete tote Zellen und Zellfragmente entfernt. Die nach dem Mediumwechsel bestimmte Zelldichte betrug bei Kulturen von Kardiomyozyten junger Ratten 44±12 Zellen/mm² und bei alten Ratten 24±12 Zellen/mm².

3.3. Dehnungsapparatur

Die Flexercell Strain Unit (Flexercell Corp., Mc Keesport, PA) ermöglicht es, Zellen, die auf einer flexiblen Oberfläche haften, unter Verwendung eines Vakuums rhythmisch und gleichförmig zu deformieren.

Dazu werden die Zellen zunächst auf den Bioflex Kulturplatten kultiviert. Es handelt sich dabei um spezielle Kulturplatten, deren Böden aus elastischen Silikonmembranen bestehen. Für die Dehnung werden die Kulturplatten in einen Inkubator (5% CO₂, 37°C) eingebracht und dort in einen Dichtungsring eingesetzt. Bis auf einen schmalen freien Rand befindet sich die flexible Membran dabei über einem kreisförmigen, planen Trägerblock. Wird ein Vakuum unter der Membran erzeugt, kommt es zu einer starken Auslenkung des freien Randes der Membran. Dies führt zu einer in alle Richtungen gleichmäßige und isotrope Dehnung des zentralen Anteils der Membran und der darauf haftenden Zellen über den Trägerblock. Wird das Vakuum aufgehoben, begibt sich die flexible Membran zurück in den Ausgangszustand. (Abb. 3.2.) Dauer, Frequenz und Amplitude der Dehnung können per Computer modifiziert werden. Die Dehnungsparameter können im Verlauf der Dehnung am Monitor verfolgt werden.

Bei den Experimenten der vorliegenden Arbeit erfolgte die zyklische mechanische Dehnung der Ventrikelmyozyten in einer Flexercell-Dehnungsapparatur mit einer Frequenz von 1Hz und einer Amplitude von 5% für 24h. Der Randbereich der

Membran, in dem es zu keiner gleichförmigen Dehnung der Membran kommt, wurde nicht zur Auswertung herangezogen.

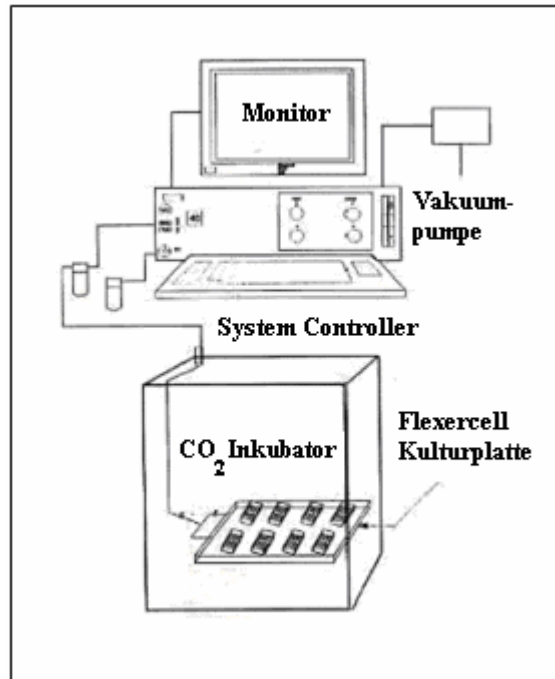


Abb. 3.1. Schematische Darstellung der verwendeten Flexercell Strain Unit

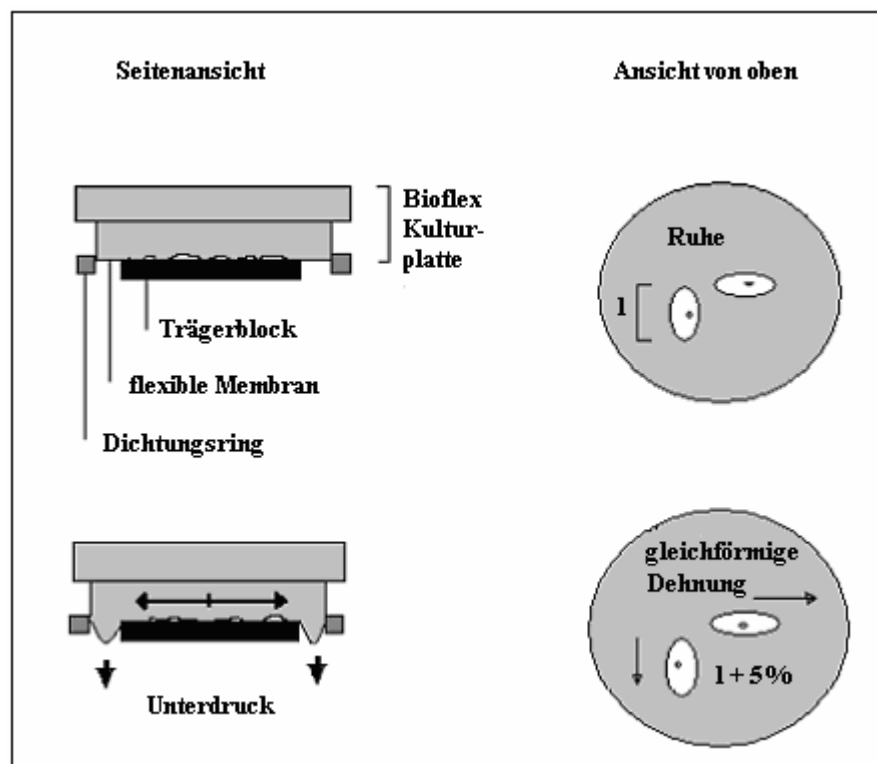


Abb. 3.2. Applikation von Dehnung auf die Bioflex Kulturplatten in der Dehnungsapparatur

3.4. Nachweis von Apoptose durch terminales Desoxynukleotidyl-Transferase vermitteltes Markieren von DNA-Strangbrüchen mit dUTP (Terminal Deoxynucleotidyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling, TUNEL)

Zellkerne apoptotischer Myozyten in Zellkulturen können durch den Nachweis typischer DNA-Strangbrüche identifiziert werden. Dabei werden 3'-OH-Enden der degradierten DNA mit Fluorescein-gekoppeltem dUTP markiert. Diese Reaktion wird durch die terminale Desoxynukleotidyl-Transferase katalysiert. Es folgt die Inkubation mit Anti-Fluorescein-Antikörpern, welche mit alkalischer Phosphatase konjugiert sind. Nach der Reaktion mit Fast Red, welches als Substrat für die alkalische Phosphatase eingesetzt wird, erfolgt die Analyse im Lichtmikroskop. Die apoptotischen Myozyten weisen einen deutlich rot gefärbten Kern auf.

Hier wurde ein In Situ Cell Death Detection Kit, AP und Fast Red Tablets (beides Boehringer Mannheim) verwendet.

3.4.1. Fixierung und Permeabilisierung

Nach 24 und 48h Kultur bzw. 24h Kultur mit darauf folgender 24-stündiger Dehnung wurden die, auf den mit Laminin beschichteten Oberflächen anhaftenden, Kardiomyozyten zunächst mit Paraformaldehyd (4% in phosphatgepufferter Kochsalzlösung = PBS; pH 7,4) im Kühlschrank über Nacht fixiert. Sie wurden dann 2x für 10min mit Glycinlösung und 1x für 10min mit PBS gespült. Die Permeabilisierung erfolgte mit 1% Triton X100 für 2h bei Raumtemperatur. Die Proben wurden dann 3x für 5min mit PBS gespült und am Rand getrocknet.

3.4.2. TUNEL-Reaktion

Für die TUNEL-Reaktion wurde nach Vorschrift des Herstellers des Kit verfahren. Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden mit 50µl TUNEL reaction mixture (Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase und Nukleotid-Mixtur) für 3h bei 37°C bedeckt und danach 3x für 5min in PBS gespült. Für die Konvertierung des Signals wurden 50µl Converter AP (Anti-Fluorescein-Antikörper, Fab Fragment vom Schaf, konjugiert mit alkalischer Phosphatase) für 1,5h bei 37°C hinzugefügt. Die Proben wurden dann wieder für 3x 5min in PBS gespült und mit je 50µl der Substratlösung (Fast Red) für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde erneut mit PBS gespült.

3.4.3. Negativ- und Positivkontrolle

- a) Für die Negativkontrolle wurde keine terminale Desoxynukleotidyl-Transferase hinzugegeben, ansonsten aber wie oben verfahren.
- b) Bei der Positivkontrolle wurden die permeabilisierten Zellen für 10min bei Raumtemperatur mit DNase I (in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1mg/ml BSA) inkubiert. Das übrige Vorgehen entspricht dem oben beschriebenen.

3.4.4. Auswertung

Untersucht wurden Kulturen von Kardiomyozyten aus 7 jungen und 11 alten Ratten. Die Auswertung erfolgte in 300 zufällig ausgewählten Arealen (je 1mm²) pro Experiment. In allen Arealen wurden die Gesamtzahl der Zellen und die Zahl der markierten Zellen mit Hilfe eines Lichtmikroskops bei 100-facher Vergrößerung bestimmt. Die in den Einzelflächen gefundene Gesamtzellzahl und die Zahl der markierten Zellen wurden jeweils addiert. Für jedes Experiment wurde der Anteil markierter Zellen an der Gesamtzellzahl in Prozent ermittelt. Aus den Ergebnissen der einzelnen Experimente wurde der Mittelwert errechnet. Die Angabe der Ergebnisse erfolgt als Mittelwert mit Standardabweichung.

Abbildung 3.3. zeigt Ventrikelmyozyten nach dUTP Nick End Labeling. Nur Zellen mit eindeutig rot gefärbten Kernen wurden als apoptotische Zellen gezählt. Identifikation von Myozyten erfolgte anhand der Morphologie.

- Abb. 3.3. (S.17)
- A Darstellung markierter Zellen bei 100-facher Vergrößerung (Positivkontrolle)
 - B apoptotische und nekrotische Ventrikelmyozyten nach dUTP Nick End Labeling (400-fache Vergrößerung)
 - C apoptotische und intakte Ventrikelmyozyten nach dUTP Nick End Labeling (400-fache Vergrößerung)

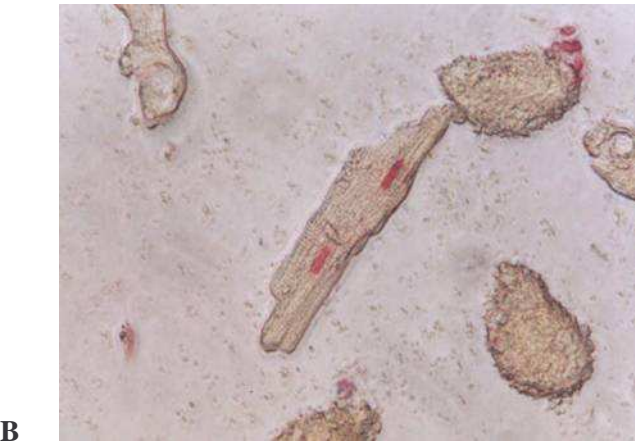


Abb. 3.3.

3.5. Nachweis von Nekrose durch Kernfärbung mit Propidiumjodid (PJ)

Propidiumjodid (Molecular Probes) bindet an das Chromatin, indem es sich zwischen die Basen der DNA einlagert. Durch eine intakte Zytoplasmamembran kann der Farbstoff nicht permeieren und ist so zum Nachweis von nekrotischen Zellen, die durch geschädigte Membranen gekennzeichnet sind, geeignet.

Die Analyse erfolgt im Fluoreszenzmikroskop.

3.5.1. Protokoll zur Färbung mit Propidiumjodid

Die Zellen wurden auf den mit Laminin beschichteten Membranen für 24h und 48h kultiviert bzw. für 24h kultiviert und dann für 24h gedehnt. Nach dem Entfernen des Mediums und zweimaligem Spülen mit PBS, wurde die Membran aus der Bioflex Kulturplatte herausgeschnitten. Dabei befand sich die Bioflex Kulturplatte in PBS.

Die herausgetrennte Membran wurde in eine Kulturschale gelegt und vor Licht geschützt bei Raumtemperatur mit 1,5mM PJ in PBS inkubiert. Nach 20min Inkubation erfolgte die Analyse im Fluoreszenzmikroskop.

Es wurden Kardiomyozytenkulturen aus Herzen 8 junger und 9 alter Ratten untersucht. Die Auswertung fand bei 200-facher Vergrößerung statt. Nur die Kerne der nekrotischen Zellen waren deutlich rot gefärbt. Die ausgewertete Fläche betrug mindestens 100mm² pro Experiment. Dabei wurden 125 zufällig ausgewählte Einzelflächen mit einer Größe von 0,8mm² betrachtet. Für jedes Experiment wurde, aus den Summen der, in den Einzelflächen bestimmten Gesamtzellzahl und der Zahl der markierten Zellen, der prozentuale Anteil der markierten Zellen bestimmt. Im Ergebnisteil ist der Mittelwert aus den einzelnen Experimenten mit Standardabweichung angegeben.

Abb. 3.4. zeigt eine nekrotische und eine intakte Zelle nach der Inkubation mit PJ.

Die Abbildungen A und C zeigen die Zellen, wie sie im Fluoreszenzmikroskop während der Analyse erschienen. Für die Abbildungen B und D wurde die Schwelle der Fluoreszenzintensität herabgesetzt, um die gesamte Zelle sichtbar zu machen. A und B zeigen je die gleiche Zelle. Es handelt sich um eine intakte Zelle. Auch C und D zeigen die gleichen Zellen. Diese Zellen sind nekrotisch. Die Zellkerne sind deutlich rot gefärbt.

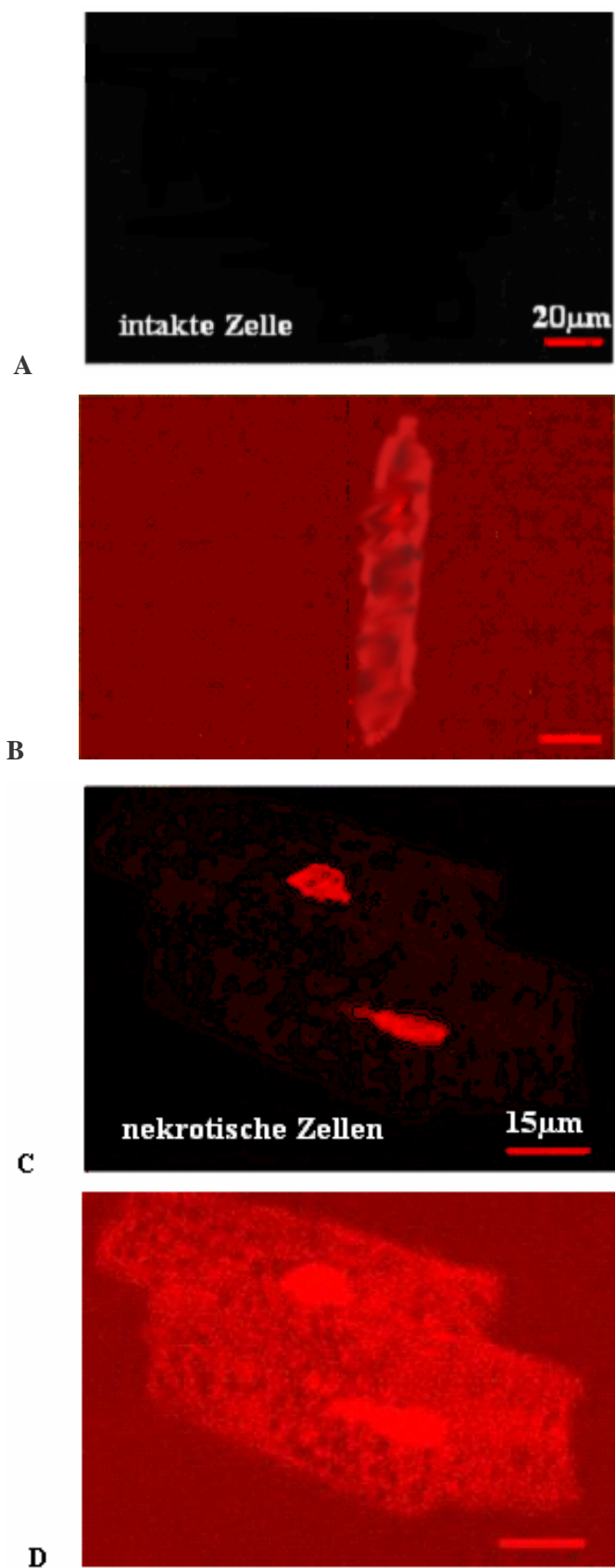


Abb. 3.4. Darstellung intakter (A, B) und nekrotischer (C, D) Zellen nach 20-minütiger Inkubation mit PJ

3.6. Nachweis von Nekrose durch Ausschlussfärbung mit 5-hexadecanoylaminofluorescein (HEDAF)

Der Fluoreszenzfarbstoff HEDAF (Molecular Probes) wird in die Membranen von Zellen integriert. In intakten Zellen stellt die Zellmembran eine Barriere dar und nur die Zellmembran wird von HEDAF markiert. Liegt aber eine Schädigung der Zellmembran vor, diffundiert der Farbstoff durch diese Schädigung in das Zytoplasma, und markiert auch intrazelluläre Membranen. Im Fluoreszenzmikroskop erfolgt die Identifizierung von intakten und nekrotischen Zellen.

3.6.1. Protokoll zur Färbung mit 5-hexadecanoylaminofluorescein

Es wurden Kulturen von Kardiomyozyten aus 8 jungen und 9 alten Ratten untersucht. Nach 24h und 48h Kultur bzw. 24h Kultur+24h Dehnung der Zellen wurde das Kulturmedium entfernt und die Proben 2x mit PBS gespült. Die Membranen wurden aus den Bioflex Kulturplatten herausgetrennt und in eine Kulturschale gelegt. Dort erfolgte die Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur für 10min mit 5 μ M HEDAF in PBS. Die Analyse erfolgte unverzüglich im Fluoreszenzmikroskop bei 200-facher Vergrößerung. Die ausgewertete Fläche betrug 100mm² pro Experiment. Diese Fläche ergab sich aus 125 betrachteten Einzelflächen mit einer Größe von 0,8mm². In den Einzelflächen wurden jeweils die Gesamtzellzahl und die Zahl markierter Zellen bestimmt. Die einzelnen Gesamtzellzahlen und die Zahlen der markierten Zellen wurden addiert und für jedes Experiment der prozentuale Anteil der markierten Zellen an der Gesamtzellzahl errechnet. Aus den Ergebnissen der einzelnen Experimente wurde der Mittelwert gebildet. (Abb. 3.5. S.21)

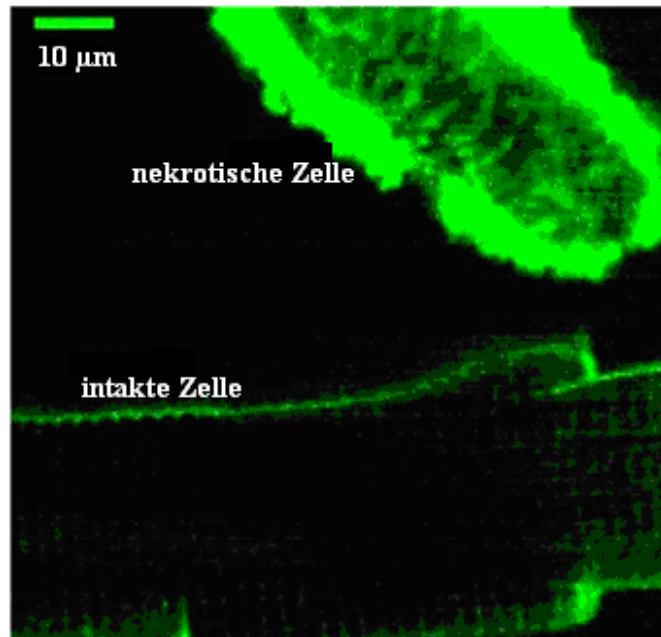


Abb. 3.5. Nekrotische und intakte Zelle nach 10-minütiger Inkubation mit HEDAF

3.7. Nachweis von Nekrose durch Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase (LDH)-Aktivität im Überstand

Die im Verlauf der Nekrose eintretende Zerstörung der Zytoplasmamembran führt zur Freisetzung zytoplasmatischer Bestandteile. Auf diese Weise gelangen auch zytoplasmatische Enzyme in das Zellkulturmedium. Die meisten dieser Enzyme werden schnell degradiert. Die Lactat-Dehydrogenase ist allerdings auch extrazellulär stabil und bleibt aktiv. Sie kann deshalb zum Nachweis einer Kontinuitätsunterbrechung der Zytoplasmamembran genutzt werden.

Lactat-Dehydrogenase katalysiert die Reduktion von Pyruvat zu Lactat. Dabei entsteht durch Oxidation von NADH eine äquimolare Menge von NAD. Photometrisch kann die Konzentrationsänderung von NADH erfasst werden. Die Änderung der Absorption bei einer Wellenlänge von 340nm ist direkt proportional zur LDH-Aktivität in der Probe.

Hier wurde die Aktivität der LDH, die aus Kardiomyozyten junger und alter Ratten freigesetzt wurde, mit Hilfe des LDH assay kits (Sigma) bestimmt.

3.7.1. Durchführung

Nach 24 und 48h Kultur bzw. 24h Kultur mit folgender 24-stündiger Dehnung wurde zunächst mit Hilfe eines Lichtmikroskops (100-fache Vergrößerung) die Gesamtzellzahl ermittelt, danach die LDH-Aktivität im Zellmedium gemessen. Dann wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gespült. Um die gesamte LDH-Aktivität in den Myozyten bestimmen zu können, wurden die Proben für 1h mit einer 1% Triton X100 Lösung inkubiert.

Die bestimmten Aktivitäten wurden jeweils auf die Zellzahl berechnet. Die LDH-Aktivität wird hier als relative LDH-Aktivität angegeben. Diese ist definiert als LDH-Aktivität im Zellmedium geteilt durch die Summe von LDH-Aktivität im Zellmedium und LDH-Aktivität in den Zellen.

Alle Ergebnisse werden als Mittelwert±Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Student's t-Test bzw. der ANOVA-Methode mit Bonferroni t-Test. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

Um Art und Ausmaß dehnungsinduzierten Untergangs von Ventrikelmyozyten bestimmen zu können, wurde die Zahl intakter und apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen nach 24 und 48h Kultur und nach 24h Kultur mit darauf folgender 24-stündiger Dehnung bestimmt.

Untersucht wurden Zellkulturen von Ventrikelmyozyten junger und alter Ratten. Um zwischen Zellen mit intakter und beschädigter Zellmembran unterscheiden zu können, wurden Färbungen mit HEDAF und PJ eingesetzt. Die Vitalität der Zellen lag zum Zeitpunkt der Aussaat bei Myozyten junger Ratten bei $67,4 \pm 10,2\%$ und bei Myozyten alter Ratten bei $61,2 \pm 7,3\%$. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant.

	Myozyten junger Ratten (n=8)	Myozyten alter Ratten (n=9)
Anteil HEDAF- markierter Zellen	$34,2 \pm 11,0\%$	$38,6 \pm 7,0\%$
Anteil PJ-markierter Zellen	$31,1 \pm 9,7\%$	$38,9 \pm 8,0\%$
Anteil von Zellen mit intakter Zellmembran	$67,4 \pm 10,2\%$	$61,2 \pm 7,3\%$

Abb. 4.1. Qualität der Zellpräparation zum Zeitpunkt der Aussaat

Die Zahl der, auf den Kulturflächen anhaftenden, Myozyten war bei jungen Ratten signifikant höher als bei alten Ratten. Die Zelldichte nach 24h Kultur betrug bei jungen Ratten 44 ± 12 Zellen pro mm^2 und bei alten Ratten $24 \pm 8^*$ Zellen pro mm^2 (* $p < 0,01$).

Zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Messungen blieb die Gesamtzahl der Zellen in den jeweiligen Kulturen unverändert. (Abb. 4.2.)

	24h Kultur	48h Kultur	24h Kultur und 24h Dehnung
Zellzahl (Mittelwert ± Standardabweichung)			
1. in mit PJ behandelten Kulturen junger Ratten	4414 ±1240	4301 ±1317	4362 ±2666
2. in mit HEDAF behandelten Kulturen junger Ratten	4452 ±1127	4264 ±1185	4124 ±2059
3. in mit PJ behandelten Kulturen alter Ratten	2367 ±921	2462 ±807	2367 ±477
4. in mit HEDAF behandelten Kulturen alter Ratten	2403 ±793	2473 ±595	2250 ±606

Abb. 4.2. Durchschnittliche Gesamtzahl der untersuchten Myozyten auf einer Fläche von 100mm² zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten

4.1. Spontaner nekrotischer Zelltod von kultivierten Kardiomyozyten

Der spontane nekrotische Zelltod wurde in Ventrikelmyozyten aus Herzen 9 alter und 8 junger Ratten untersucht. Die Zahl intakter und zugrunde gegangener Zellen wurde nach 24h und 48h Kultur ermittelt. Die Zellen wurden dabei nicht gedehnt.

Die Färbung mit PJ ergab nach 24h Kultur einen Anteil nekrotischer Myozyten von $24,6\pm 5,5\%$ in Kulturen junger Ratten bzw. $19,4\pm 5,5\%$ in Kulturen alter Ratten. Der nach 48h Kultur bestimmte Anteil nekrotischer Zellen war in Kulturen von Myozyten alter Ratten signifikant höher ($28,2\pm 6,0\%$) als nach 24h ($p<0,014$). Für Kulturen von Zellen junger Ratten ergab sich kein Unterschied ($30,7\pm 10,6\%$). (Abb.4.10.1. bzw. 4.10.2.)

Zwischen Kulturen von Kardiomyozyten aus jungen und alten Ratten bestand weder nach 24h noch nach 48h Kultur ein signifikanter Unterschied in der Anzahl nekrotischer Myozyten. (Abb.4.3. bzw. Abb.4.4.)

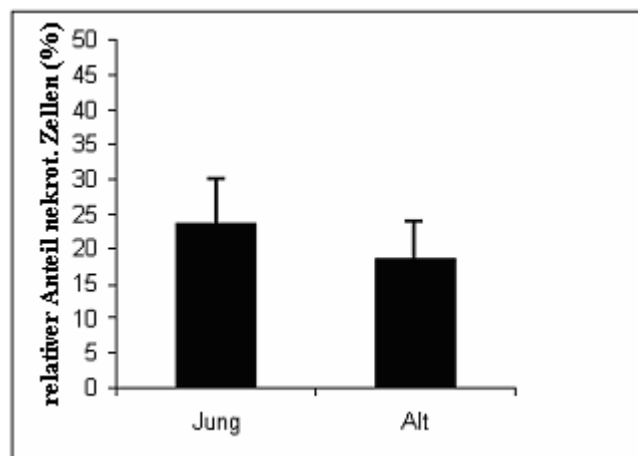


Abb. 4.3. Anteil nekrotischer Myozyten an der Gesamtzahl der untersuchten Kardiomyozyten aus jungen und alten Ratten in % nach 24h Kultur bestimmt durch PJ-Färbung

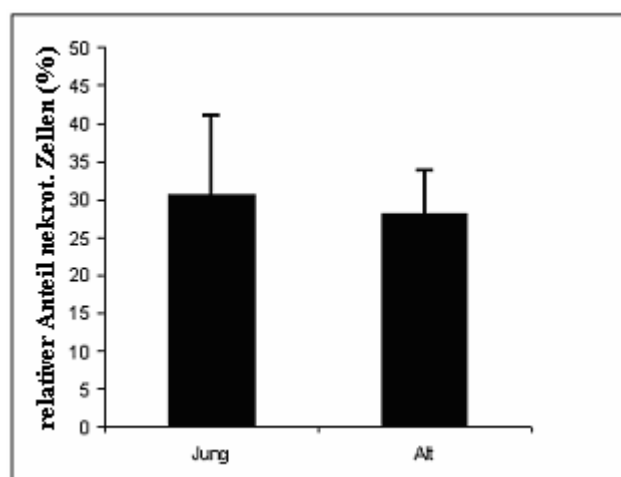


Abb. 4.4. Anteil nekrotischer Myozyten an der Gesamtzahl der untersuchten Kardiomyozyten aus jungen und alten Ratten in % nach 48h Kultur bestimmt durch PJ-Färbung

Durch Färbung mit HEDAF wurden nach 24h Kultur $31,7 \pm 8,7\%$ nekrotische Zellen in Kulturen von Myozyten junger Ratten und $27,3 \pm 6,9\%$ nekrotische Myozyten in Kulturen von Myozyten alter Ratten gefunden. (Abb. 4.5.) Es ergab sich kein Unterschied zwischen für 24h und 48h kultivierten Zellen. (Abb. 4.11.1. und 4.11.2.) Nach 48h wurden $35,7 \pm 6,5\%$ (jung) bzw. $34,6 \pm 6,5\%$ (alt) nekrotische Zellen identifiziert. (Abb. 4.6.) Der Unterschied zwischen Kulturen von Myozyten junger und alter Ratten war weder nach 24h noch nach 48h statistisch signifikant.

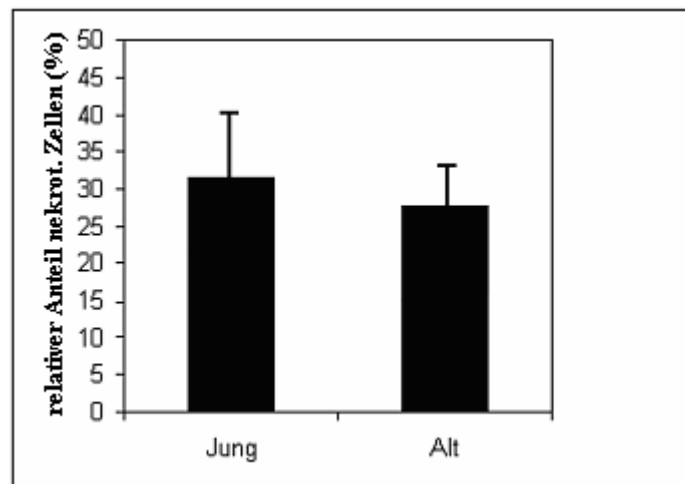


Abb. 4.5. Anteil nekrotischer Myozyten an der Gesamtzahl der untersuchten Kardiomyozyten aus jungen und alten Ratten in % nach 24h Kultur bestimmt mit der Hilfe von **HEDAF**

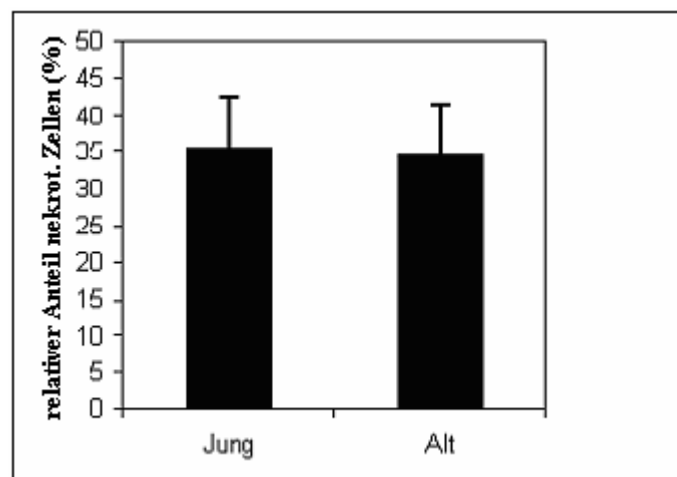


Abb. 4.6. Anteil nekrotischer Myozyten an der Gesamtzahl der untersuchten Kardiomyozyten aus jungen und alten Ratten in % nach 48h Kultur bestimmt mit der Hilfe von **HEDAF**

Die LDH-Aktivität wurde in Kardiomyozyten 6 junger und 9 alter Ratten bestimmt. Hier dargestellt ist die relative LDH-Aktivität nach 48h. Die relative LDH-Aktivität betrug in Myozyten aus jungen Ratten $5,6 \pm 1,4\%$ und $5,6 \pm 1,2\%$ in Myozyten alter Ratten. (Abb. 4.7.) Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant.

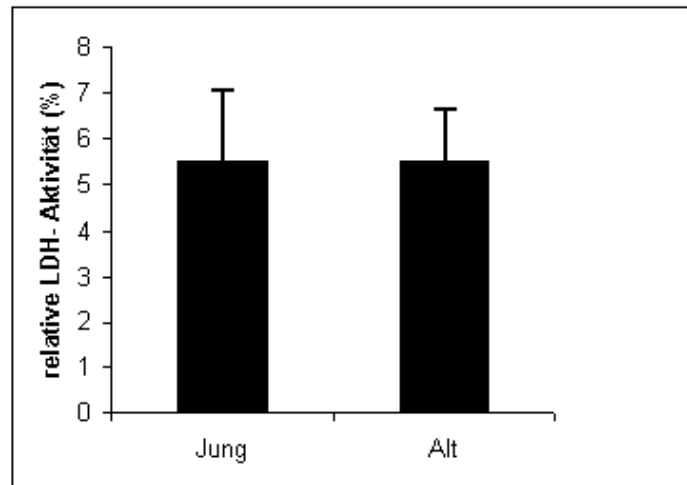


Abb. 4.7. Relative **LDH-Aktivität** bestimmt nach 48h Kultur von Myozyten aus Herzen junger und alter Ratten

Die nach 24h Kultur bestimmte relative LDH-Aktivität ist in Kulturen von Myozyten alter Ratten ($17,7 \pm 5,1\%$) und auch in Kulturen junger Ratten ($16,0 \pm 4,0\%$) signifikant höher als nach 48h Kultur. (Abb. 4.12.1. bzw. 4.12.2.) Bei der Bestimmung des Ausmaßes nekrotischen Zelltodes mit Hilfe der PJ- und HEDAF-Färbung zeigte sich ein anderes Ergebnis.

Ursache dafür ist, dass die Messung der LDH-Aktivität im Überstand nach 24h Kultur erfolgte. In dem Überstand befanden sich noch nicht angeheftete Zellen und Zellfragmente. Gemessen wurde die LDH-Aktivität aller nekrotischen Zellen.

Mit keiner der Methoden konnten signifikante altersabhängige Unterschiede in dem Anteil der Kardiomyozyten gefunden werden, die nach 24h und 48h Kultur spontaner Nekrose unterlagen.

4.2. Spontaner apoptotischer Zelltod von kultivierten Kardiomyozyten

Es wurden Kulturen von Kardiomyozyten aus 7 jungen und 11 alten Ratten untersucht. In Kulturen von Myozyten junger Ratten wurden nach 24h Kultur $0,38 \pm 0,09\%$ apoptotische Zellen identifiziert, in Kulturen alter Ratten $1,24 \pm 0,44\%$. Innerhalb einer Altersgruppe veränderte sich der relative Anteil apoptotischer Myozyten zwischen 24 und 48h Kultur nicht.

Nach 48h Kultur wurden $0,33 \pm 0,12\%$ apoptotische Zellen bei Ventrikelmyozyten aus jungen Ratten und $1,05 \pm 0,35\%$ apoptotische Zellen bei Myozyten aus alten Ratten gefunden. (Abb. 4.9.) Der Vergleich zwischen den Kulturen von Ventrikelmyozyten aus Herzen alter und junger Ratten zeigt, dass der Anteil der apoptotischen Myozyten sowohl nach 24h als auch nach 48h Kultur in Kulturen aus Kardiomyozyten alter Ratten signifikant größer war.

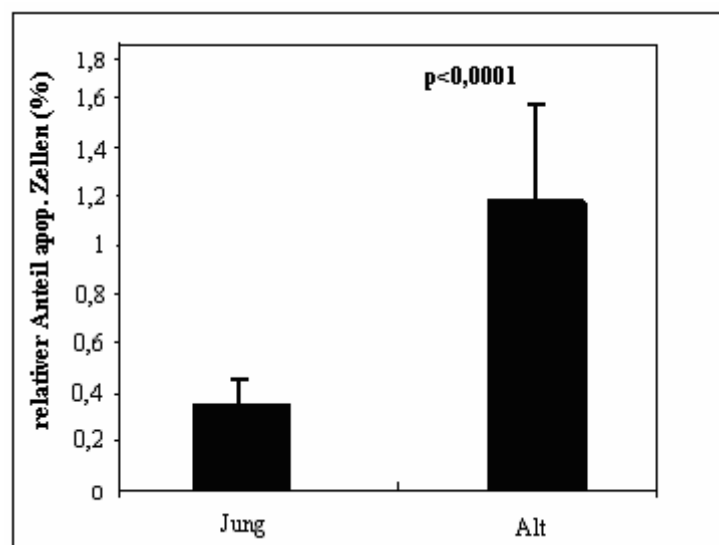


Abb. 4.8. Anteil apoptotischer Myozyten an der Gesamtzahl der untersuchten Kardiomyozyten alter und junger Ratten in % nach 24h Kultur bestimmt durch **TUNEL**

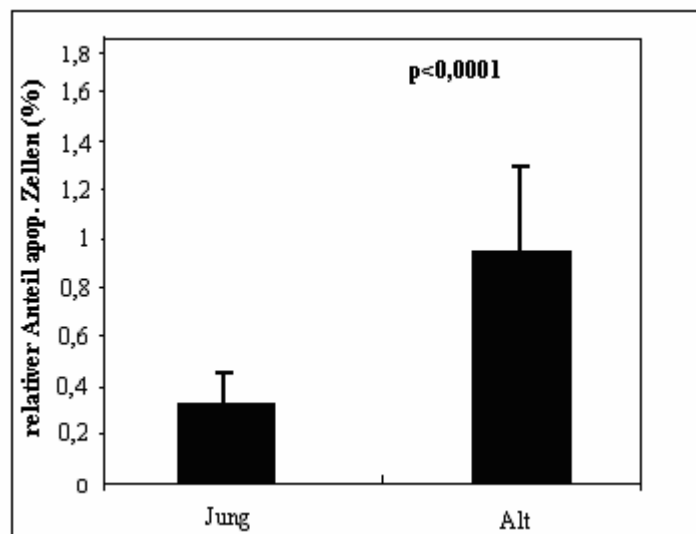


Abb. 4.9. Anteil apoptotischer Myozyten an der Gesamtzahl der untersuchten Kardiomyozyten alter und junger Ratten in % nach 48h Kultur bestimmt durch **TUNEL**

4.3. Einfluss zyklischer mechanischer Dehnung auf den nekrotischen Zelltod

4.3.1. Nekrotischer Zelltod als Folge mechanischer Dehnung bestimmt mit PJ-Färbung

Die für 48h kultivierten Myozyten dienten als Kontrollgruppe. Bei Kulturen von Ventrikelmyozyten junger Ratten wies die Kontrollgruppe $30,7 \pm 10,6\%$ nekrotische Zellen auf. Nach 24h Kultur mit darauf folgender 24-stündiger Dehnung waren $33,8 \pm 12,8\%$ der Myozyten der jungen Tiere mit PJ markiert. Dieser Unterschied war nicht signifikant.

In den untersuchten Kulturen der Myozyten alter Ratten waren in der Kontrollgruppe $28,2 \pm 6,0\%$ der Myozyten nekrotisch. In der gedehnten Gruppe fand man einen signifikanten Anstieg des Anteils nekrotischer Zellen auf $38,0 \pm 6,4\%$ ($p < 0,006$).

Die Färbung mit PJ zeigte, dass zyklische mechanische Dehnung in kultivierten Kardiomyozyten junger Ratten keinen Einfluss auf das Ausmaß nekrotischen Zelltods hat, in Myozyten alter Ratten dieses jedoch signifikant ansteigen lässt.

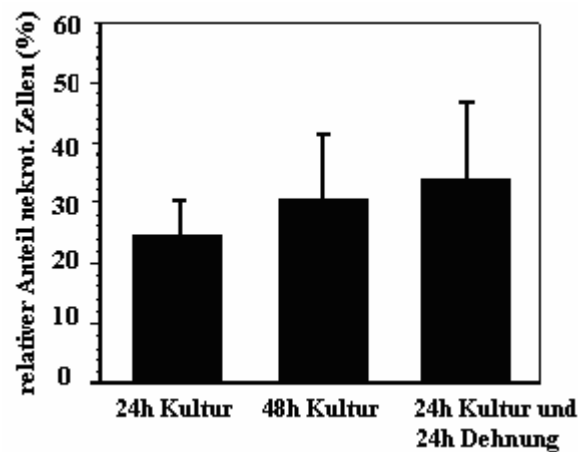


Abb. 4.10.1. Darstellung des Anteils nekrotischer Myozyten an der Gesamtzahl der Myozyten aus jungen (n=8) Ratten bestimmt durch **Propidiumjodid**-Färbung

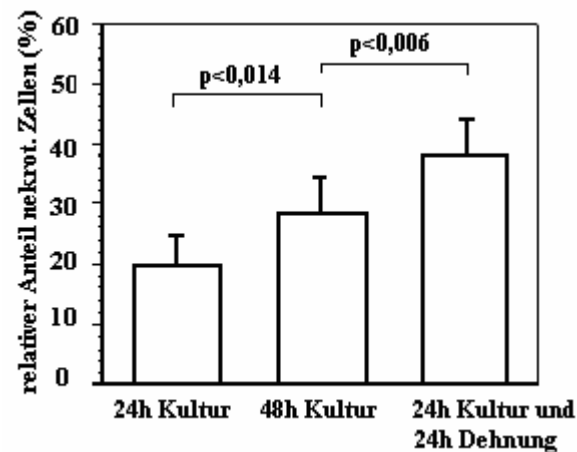


Abb. 4.10.2. Darstellung des Anteils nekrotischer Myozyten an der Gesamtzahl der Myozyten aus alten Ratten (n=9) bestimmt durch **Propidiumjodid**-Färbung

4.3.2. Nekrotischer Zelltod als Folge mechanischer Dehnung bestimmt mit HEDAF-Färbung

Nach Dehnung wurden in den Kulturen von Myozyten junger Tiere $35,7 \pm 7,7\%$ nekrotische Zellen identifiziert, in der Kontrollgruppe (48h Kultur) $35,7 \pm 6,5\%$. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war nicht signifikant.

Bei Myozyten alter Ratten zeigte sich hingegen ein signifikanter dehnungsinduzierter Anstieg von nekrotischen Zellen von $34,6 \pm 6,5\%$ auf $50,0 \pm 13,3\%$ ($p < 0,008$).

Ähnlich den Ergebnissen, die durch Färbung mit PJ erhalten wurden, zeigte die Färbung mit HEDAF eine Zunahme nekrotischen Zelltods in kultivierten Ventrikelmyozyten durch zyklische mechanische Dehnung nur in Zellen alter Ratten, nicht jedoch in Zellen junger Ratten.

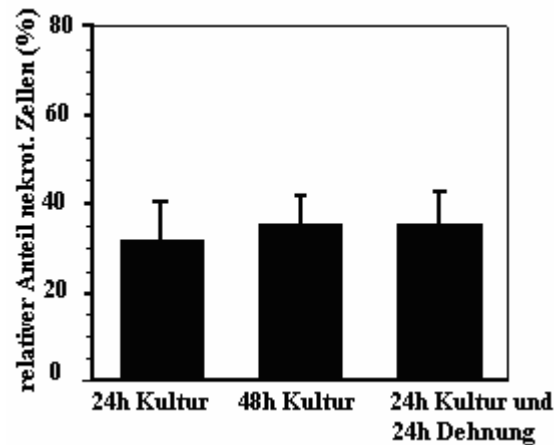


Abb. 4.11.1. Darstellung des Anteils nekrotischer Myozyten an der Gesamtzahl der Myozyten aus jungen (n=8) bestimmt durch **HEDAF**-Färbung

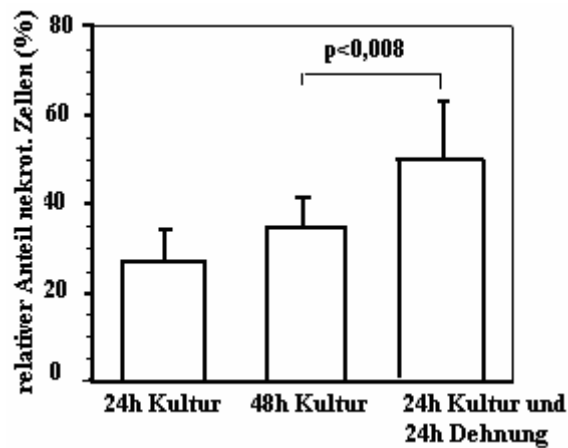


Abb. 4.11.2. Darstellung des Anteils nekrotischer Myozyten an der Gesamtzahl der Myozyten aus alten Ratten (n=9) bestimmt durch **HEDAF**-Färbung

4.3.3. Nekrotischer Zelltod als Folge mechanischer Dehnung bestimmt durch Messung der LDH-Aktivität im Zellmedium

Die relative LDH-Aktivität, die aus den Messergebnissen in Kulturen von Myozyten junger Tiere errechnet wurde, wurde durch Dehnung nicht beeinflusst. ($5,6 \pm 1,4\%$ in der Kontrolle; nach Dehnung $5,6 \pm 1,9\%$). In Kulturen von Myozyten alter Tiere führte Dehnung zu einem signifikanten Anstieg der relativen LDH-Aktivität von $5,6 \pm 1,2\%$ auf $8,4 \pm 3,3\%$ ($p < 0,05$). (Abb. 4.12.1. und 4.12.2.)

Dehnung konnte in Kardiomyozyten aus jungen Ratten nekrotischen Zelltod nicht induzieren. In Myozyten aus alten Ratten steigerte zyklische mechanische Dehnung den Anteil nekrotischer Zellen.

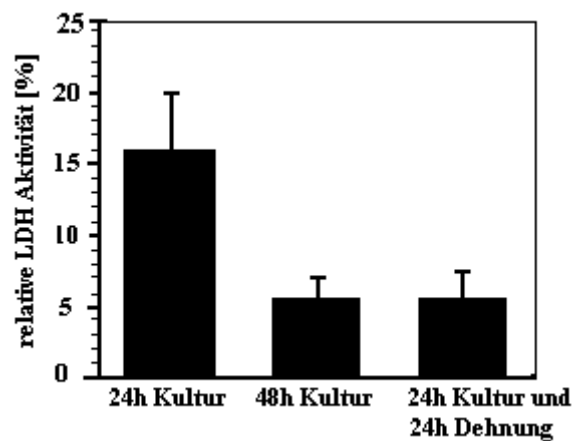


Abb. 4.12.1. Darstellung der relativen **LDH-Aktivität** in jungen ($n=6$) Ratten

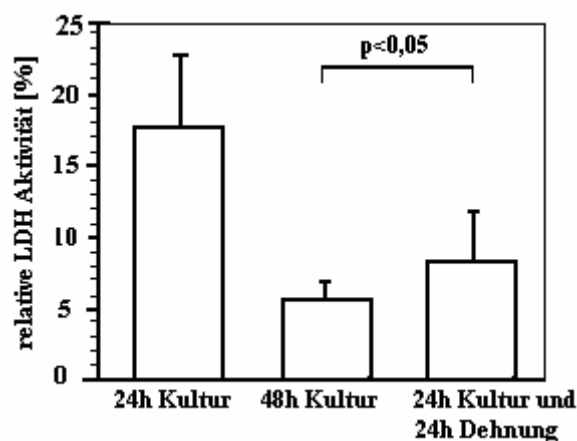


Abb. 4.12.2. Darstellung der relativen **LDH-Aktivität** in alten ($n=9$) Ratten

Die mit Hilfe von HEDAF- und PJ-Färbung bzw. Bestimmung der LDH-Aktivität erlangten Ergebnisse zeigen übereinstimmend, dass in Kulturen von Kardiomyozyten junger Ratten zyklische mechanische Dehnung keinen Einfluss auf den Anteil nekrotischer Myozyten hat, aber den Anteil nekrotischer Myozyten in Kulturen aus alten Ratten signifikant steigert.

4.4. Einfluss zyklischer mechanischer Dehnung auf den apoptotischen Zelltod

Bei Kardiomyozyten aus Herzen junger Ratten zeigte sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe nach Dehnung eine 1,8-fache Steigerung des Anteils apoptotischer Myozyten. Die Kontrollgruppe wies $0,33 \pm 0,12\%$ apoptotische Zellen auf, von den gedehnten Zellen waren $0,58 \pm 0,18\%$ apoptotisch.

Der Anteil apoptotischer Myozyten aus Herzen alter Ratten zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen gedehnter und ungedehnter Gruppe (gedehnt $0,98 \pm 0,22\%$; Kontrolle $1,05 \pm 0,35\%$).

Mechanische Dehnung hatte also keinen Einfluss auf die Zahl apoptotischer Kardiomyozyten alter Ratten, steigerte jedoch die Zahl apoptotischer Kardiomyozyten junger Ratten

(Abb. 4.13.1. und 4.13.2.)

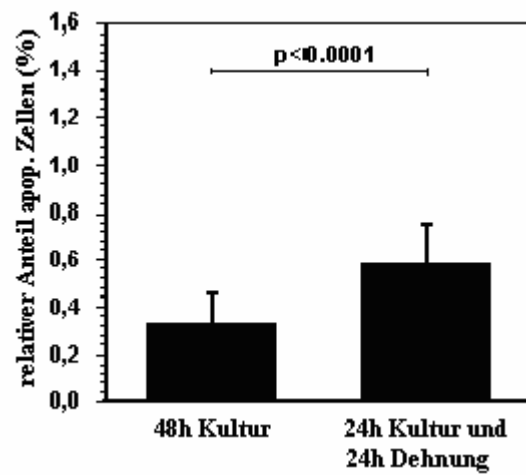


Abb. 4.13.1. Darstellung des Anteils apoptotischer Myozyten an der Gesamtzahl der Myozyten junger (n=7) Ratten bestimmt durch TUNEL

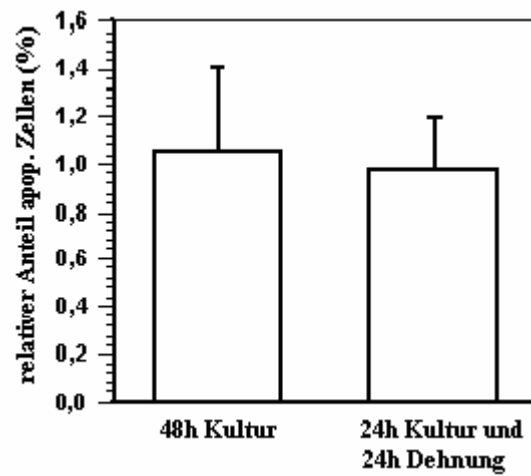


Abb. 4.13.2. Darstellung des Anteils apoptotischer Myozyten an der Gesamtzahl der Myozyten alter (n=11) Ratten bestimmt durch TUNEL

5. Diskussion

Die Literatur berichtet, dass im Verlauf des Alterungsprozesses ein Verlust von Kardiomyozyten auftritt. [2, 75, 42, 73, 71] Unklarheit herrscht über die Art und die Ursachen dieser Zelluntergänge. Der Verlust von Myozyten kann zu einer Funktionsbeeinträchtigung des Myokards führen, was eine folgenschwere Veränderung für den gesamten Organismus darstellt. [52, 61, 94, 86] Da Verluste von Herzmuskelzellen nicht durch mitotische Teilung repariert werden können, steigt die Kraft, die pro Flächeneinheit des Wandquerschnitts (Wandspannung) aufgebracht werden muss. [53, 87, 105] Von den überlebenden Zellen wird eine erhöhte Kraft gefordert. Dies führt zur Hypertrophie der Zellen. [2, 75, 73, 42]

Die Identifikation der Mechanismen, die zu Zellverlusten im Herzen führen, stellt das Ziel verschiedener Untersuchungen dar. Differenziert werden muss dabei zwischen nekrotischem und apoptotischem Tod von Kardiomyozyten. Apoptotische Veränderungen sind reversibel, solange der Zellkern funktionell intakt ist. Sind Zeichen nekrotischen Zelltodes, wie Schädigung des Sarkolemm eingetreten, ist der Untergang der Zelle nicht mehr zu verhindern.

Da der Verlust von Zellen zu Änderungen der mechanischen Belastung der nicht untergegangenen Zellen führt, soll der Einfluss von Dehnung auf die Zelluntergänge untersucht werden. Gezeigt wurde bereits, dass mechanische Dehnung in Kardiomyozyten von Ratten Apoptose induzieren kann. [14, 54] Hier sollte der Einfluss mechanischer Dehnung auf Apoptose und Nekrose in Abhängigkeit vom Lebensalter analysiert werden. Die erhofften Ergebnisse dieser Arbeit über mechanisch-induzierte Apoptose und Nekrose in Abhängigkeit vom Alter sollten zur Forschung über die Ursachen altersbedingten Zellverlustes beitragen. Dies erlangt besondere Bedeutung dadurch, dass kardio-vaskuläre Erkrankungen die häufigsten Todesursachen alter Menschen darstellen. [87]

In der vorliegenden Arbeit wurden Kulturen von isolierten Rattenkardiomyozyten untersucht. Adulte kultivierte Kardiomyozyten der Ratte weisen eine relativ hohe basale Apoptoserate auf. [54, 56] Diese starke Aktivierung des apoptotischen Programms ohne Applikation eines apoptotischen Stimulus wird in Zusammenhang mit der Auflösung ursprünglich bestehender Zellkontakte und

Zytoskelettverankerungen infolge der enzymatischen und mechanischen Vereinzelungsmechanismen bei der Präparation gebracht. In den für diese Arbeit untersuchten Kulturen waren $0,33 \pm 0,12\%$ (jung, 48h Kultur) bzw. $1,05 \pm 0,35\%$ (alt, 48h Kultur) der Zellen apoptotisch. Auch das insgesamt sehr große Ausmaß des nekrotischen Zelltodes ist vermutlich, ausgelöst durch Ca^{2+} -overload, Schädigung der Zellmembran oder der Gap junctions, eine Folge von Präparation, Isolation und Kultur. Nach 48h Kultur waren $30,7 \pm 10,6\%$ (jung, PJ-Färbung) bzw. $28,2 \pm 6,0\%$ (alt, PJ-Färbung) der Myozyten nekrotisch. Bei in vivo Untersuchungen im Rattenmyokard wurden 0,001% apoptotische Myozyten in 3 Monate alten Ratten identifiziert. Der Anteil nekrotischer Myozyten war 7-fach größer. Bei 24-monatigen Ratten fand man 0,0086% apoptotische Myozyten. Der Anteil nekrotischer Myozyten war 16-fach größer. [42]

Die meisten für den Ventrikel vorliegenden Arbeiten, die Angaben über programmierten Zelltod enthalten, stützen sich auf das Markieren der apoptotischen Zellen mit Hilfe des TUNEL. Jedoch gehen die Meinungen über die Spezifität dieser Methode für die Identifikation apoptotischer Zellen auseinander. [24] Grundprinzip des TUNEL ist die Markierung von Doppelstrangbrüchen der DNA, die für den apoptotischen Zelltod typisch sind.

Eine elektronenmikroskopische Untersuchung TUNEL-positiver Myozyten aus humanen Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie zeigte, dass markierte Zellen weder apoptotische noch nekrotische ultrastrukturelle Merkmale aufwiesen, sondern eine erhöhte Aktivität von Reparationsprozessen der DNA zeigten. [45] Die gleiche Autorengruppe wies darauf hin, dass in Infarktgebieten von Kaninchenherzen in TUNEL-positiven Myozyten DNA-Degradation und eine für nekrotischen Zelltod typische Morphologie beobachtet werden konnte. [72] Andere Untersuchungen zeigen hingegen, dass zwischen Ergebnissen, die mit Hilfe des TUNEL erhalten wurden, und Ergebnissen, die durch andere Methoden erlangt wurden, keine signifikanten Unterschiede gefunden werden konnten. [54, 60, 41] Untersuchungen am Myokard von Ratten und Mäusen zeigten keine Markierung nekrotischer Zellen durch TUNEL bzw. bestätigten die Spezifität des TUNEL mit Hilfe des konfokalen Mikroskops. [60, 42] Obwohl es immer wieder Diskussionen über die Spezifität und Interpretation der Methode gibt, wird der Nachweis nukleärer DNA-Veränderungen durch die TUNEL-Methode allgemein zur Detektion apoptotischer Zellen eingesetzt. Wegen möglicher Einschränkungen der Aussagefähigkeit des TUNEL werden häufig

zusätzlich weitere Nachweismethoden, wie Darstellung einer DNA-Leiter oder Nachweis von Nukleosomen im Zytoplasma, eingesetzt.

Für den Erhalt verlässlicher und reproduzierbarer Ergebnisse ist eine sorgfältige Standardisierung des TUNEL-Tests erforderlich. [89] Dies erfolgte durch Behandlung von Zellen mit DNase I, um DNA-Strangbrüche enzymatisch hervorzurufen. Außerdem kann eine zu geringe Zahl von untersuchten Myozyten zu fehlerhaften Aussagen führen. Ursache für falsch negative Ergebnisse wäre die sehr geringe Menge von apoptotischen Zellen im Myokard. [74, 89] In dieser Arbeit erfolgte die Quantifizierung der Apoptose deshalb in vielen Gesichtsfeldern und an einer sehr großen Anzahl von Zellen.

In den für diese Arbeit untersuchten Kulturen waren nach 48h Kultur $0,33 \pm 0,12\%$ der Zellen in Kulturen junger Ratten und $1,05 \pm 0,35\%$ der Zellen in Kulturen alter Ratten apoptotisch. Dabei bestand kein signifikanter Unterschied zu den nach 24h Kultur ermittelten Zahlen spontanen Zelltodes. Der Anteil apoptotischer Zellen war in Kulturen alter Ratten signifikant höher als in Kulturen junger Ratten. Bekannt ist, dass die Produktion von ROS mit zunehmendem Alter steigt und damit das mitochondriale Transmembranpotential sinkt, was die Auslösung apoptotischen Zelltodes fördert. [58, 28, 21] Es ist weiterhin gezeigt worden, dass die Expression von antiapoptotischem Bcl-2 in Ventrikelmyozyten alter Ratten nach 48h Kultur signifikant niedriger war als in Myozyten junger Ratten, während sich für die Expression von Bax kein Unterschied zwischen alten und jungen Ratten ergab. [36] Da das Verhältnis von Bcl-2 und Bax über Auslösung oder Hemmung der apoptotischen Signalkaskade entscheidet [52], kann spekuliert werden, dass die vermehrte Auslösung spontanen apoptotischen Zelltodes in kultivierten Ventrikelmyozyten alter Ratten über den mitochondrialen Weg der Apoptoseinduktion vermittelt wird.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse über spontane Nekrose in Kulturen von Kardiomyozyten nach 24h sind nicht einheitlich, was seine Ursache in Unterschieden zwischen den eingesetzten Nachweismethoden findet. Die LDH-Aktivität nach 24h Kultur war signifikant höher als nach 48h Kultur. Markierung nekrotischer Zellen mit PJ und HEDAF zeigte keinen entsprechend höheren Anteil nekrotischer Zellen. Die Messung der LDH-Aktivität erfolgte nach 24h Kultur im Zellüberstand, in dem sich auch tote Zellen befanden, die nicht an die Kulturschale angeheftet waren. Vor der Färbung der Zellen mit PJ bzw. HEDAF wurde das Medium entfernt und gespült.

So war nach 48h Kultur eine deutlich niedrigere LDH-Aktivität in Kulturen von Kardiomyozyten junger und alter Ratten zu messen. Die nach 24h Kultur erlangten Ergebnisse durch Färbung mit PJ und HEDAF können deshalb nicht mit den Ergebnissen, die durch Bestimmung der LDH-Aktivität erhalten wurden, verglichen werden.

Bei Markierung mit PJ konnte bei Kulturen von Myozyten junger Ratten kein Unterschied im Ausmaß der Nekrose zwischen 24h und 48h Kultur gefunden werden. Markierung mit HEDAF führte zu dem gleichen Ergebnis. In Kulturen alter Ratten war in den mit PJ behandelten Kulturen eine signifikante Zunahme nekrotischer Zellen zu beobachten. Markierung mit HEDAF zeigte eine Zunahme, die aber nicht signifikant war.

Insgesamt war sowohl nach 24h als auch nach 48h Kultur das Ausmaß des nekrotischen Zelltodes deutlich größer als das Ausmaß des apoptotischen Zelluntergangs.

Obwohl im Rattenmyokard in vivo ebenfalls eine höhere Zahl nekrotischer als apoptotischer Zellen beobachtet wurde, erreicht der nekrotische Zelltod dabei nicht die großen Ausmaße wie in der Zellkultur. [42] Offenbar gehen Zellen nach dem Anheften an die Bioflex Membran eher durch nekrotischen als durch apoptotischen Zelltod zugrunde. In Studien an adulten isolierten Rattenkardiomyozyten ist gezeigt worden, dass nekrotischer Zelltod nur in der frühen Phase der Kulturzeit vorherrscht, während später spontane Zelluntergänge hauptsächlich über den apoptotischen Weg ablaufen. [45] Dies lässt vermuten, dass die zunächst sehr hohen nekrotischen Zelluntergänge als Folge von Isolation und Präparation auftreten.

Bereits berichtet worden war, dass Dehnung in Kardiomyozyten Apoptose induzieren kann. [14, 56, 57, 82] Bemerkenswert ist, dass die vorliegenden Erkenntnisse über dehnungsinduzierten programmierten Zelltod aus Untersuchungen von Kardiomyozyten neonataler [63, 83] und junger [14, 56] Tiere stammen. Manchmal fehlen Angaben über das Alter der Versuchstiere. [57] Bei Studien an humanen Kardiomyozyten findet man meist ein breites Altersspektrum der Patienten. [92, 89, 6]

Wie in verschiedenen Veröffentlichungen beschrieben, konnte auch in der vorliegenden Arbeit in Kardiomyozyten junger Ratten durch Dehnung Apoptose induziert werden. In Ventrikelmyozyten aus Herzen alter Ratten war hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen den gedehnten Kulturen und der Kontrollgruppe vorhanden. Einhergehend mit diesen Ergebnissen zur Induktion von Zelltod durch

Dehnung ist gezeigt worden, dass nach Dehnung von kultivierten Ventrikelmyozyten junger Ratten eine Erhöhung von Nukleosomen im Zytoplasma zu finden war. In Myozyten alter Ratten war dies nicht der Fall. [36]

In Myozyten alter Ratten wurde durch zyklische mechanische Dehnung nekrotischer Zelltod induziert. Bei Myozyten aus Herzen junger Ratten steigerte Dehnung den Anteil nekrotischer Zellen nicht.

Myozyten aus Herzen junger und alter Ratten sind fähig den Weg des apoptotischen und des nekrotischen Zellunterganges zu beschreiten. Mit zunehmendem Lebensalter ändert sich die Reaktion der Zellen auf einen mechanischen Stimulus. Auf Dehnung reagieren Myozyten aus Herzen alter Ratten mit einem vermehrten Zelluntergang durch nekrotischen Zelltod. Vermutet werden kann, dass sich in Kardiomyozyten mit zunehmendem Alter die Fähigkeit verschlechtert, auf Signale, die durch mechanischen Stress induziert werden, mit der Auslösung des apoptotischen Programms zu reagieren. Verschiedene altersbedingte Veränderungen können dies verursachen.

Die im Alter größere Steifheit des Sarkolemms kann zu einer größeren Anfälligkeit für dehnungsinduzierte Membranschäden führen. Altersbedingte Veränderungen der Zusammensetzung der Phospholipiddoppelschicht der Plasmazellmembran sind gekennzeichnet durch einen erhöhten Anteil gesättigter Fettsäuren. Das führt zu einer Zunahme der Rigidität der Membran. [63] Dadurch könnte ein gleicher Reiz (Dehnung) leichter Defekte in der Membran hervorrufen. Kontinuitätsunterbrechung des Sarkolemms gefolgt von einem Ca^{2+} -Einstrom führt zu nekrotischem Zelltod.

Eine weitere häufig diskutierte mit zunehmendem Lebensalter einhergehende Veränderung, ist die veränderte Funktion der Mitochondrien. So kommt es mit zunehmendem Alter vermehrt zu Beeinträchtigungen im Ablauf der oxidativen Phosphorylierung. Dies könnte die Unfähigkeit der Kardiomyozyten aus Herzen alter Ratten begründen, auf mechanische Dehnung mit der Ausführung der ATP-abhängigen apoptotischen Signalkaskade zu reagieren.

Liu et al. haben berichtet, dass nach Ischämie durch Verschluss der Koronararterie die Infarktgröße in Herzen alter Ratten signifikant größer war als in Herzen junger Ratten. [61] Die Verschlechterung der Mitochondrienfunktion mit zunehmendem Alter könnte, besonders in Zeiten größeren Energiebedarfs, wie bei Reparationsaufgaben und Erhaltung der osmotischen Balance, zu Energiedefiziten führen. [29]

Neben altersbedingten Beeinträchtigungen bei der ATP-Synthese gibt es weitere Veränderungen der Mitochondrien, die mit höherem Lebensalter auftreten und die erhaltenen Ergebnisse begründen könnten. Es ist gezeigt worden, dass die Expression von Bcl-2 in Ventrikelmyozyten alter Ratten nach 48h Kultur signifikant niedriger war als in Myozyten junger Ratten, während sich für die Expression von Bax kein Unterschied zwischen alten und jungen Ratten ergab. Nach zyklischer mechanischer Dehnung sank die Konzentration von Bcl-2 in Myozyten junger Ratten, nicht jedoch in Myozyten alter Ratten. Kein signifikanter Unterschied wurde für die Konzentration von Bax zwischen der gedehnten und der ungedehnten Gruppe bei Myozyten sowohl alter als auch junger Ratten gefunden. In Myozyten junger Ratten wurde nach Dehnung außerdem eine Cytochrom c Erhöhung im Zytosol und eine Abnahme der Konzentration von Cytochrom c in der Membranfraktion beobachtet. [36]

Für p53 ergaben sich nach 48h Kultur keine Unterschiede zwischen alten und jungen Ratten. Nach Dehnung wurde in Myozyten junger Ratten ein Anstieg der p53 Konzentration gefunden, nicht jedoch in Myozyten alter Ratten. [36] p53-abhängige Transkription von Genen kann den apoptotischen Prozess aktivieren. Vermutlich ist auch eine transkriptionsunabhängige Aktivierung möglich. [20, 43, 47, 54, 57] Einhergehend mit der Aktivierung von p53 und p53-abhängigen Genen wird eine dehnungsabhängige Synthese und Sekretion von Angiotensin II beobachtet. Die Bindung von p53 an den Promotor von Angiotensinogen, AT1 Rezeptor und Bax stieg mit Dehnung, ebenso die Expression von Angiotensinogen, AT1 und AT2 Rezeptor, Renin, Angiotensin-converting enzyme (ACE), p53 und Bax. Die Expression von Bcl-2 sank. P53 scheint eine bedeutsame Rolle in der Regulation des lokalen Renin-Angiotensin Systems und dehnungsinduzierter Apoptose zu spielen. [54, 57, 55, 64] IGF-1 hemmt p53 und verringert die Zahl apoptotischer Zellen nach Dehnung. [56]

Zyklische mechanische Dehnung steigert in Rattenkardiomyozyten die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, wobei die Höhe der Steigerung mit dem Ausmaß der Dehnung zunimmt. [83] Gesteigerte Produktion von ROS kann Zelltod hervorrufen. Dies geschieht vermutlich über eine ROS-induzierte Aktivierung von JNK und Steigerung der mitochondrialen Membranpermeabilität gefolgt von der Freisetzung proapoptotischer Proteine in das Zytoplasma. [3, 106, 58, 97, 9, 75]

Erhöhung der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration kann ebenfalls zur Unterbrechung des mitochondrialen Transmembranpotentials führen, und so die mitochondriale

apoptotische Signalkaskade aktivieren. [10, 23] Mechanische Stimuli modulieren in Ventrikelmyozyten Ionenströme durch nichtselektive Kationenkanäle, die zu einer dehnungsinduzierten Steigerung der intrazellulären Na^+ - und Ca^{2+} -Konzentration führen. [114, 37]

Kontrovers diskutiert wird eine dehnungsinduzierte Erhöhung der Expression von Fas. Fas ist ein Rezeptor, der in Kardiomyozyten, nach Bindung seines Liganden der Weiterleitung des apoptotischen Signals in das Zellinnere dient. [108] Bei einer in vitro Überdehnung von Zellen der Papillarmuskeln konnte neben einer Erhöhung der Zahl apoptotischer Myozyten eine verstärkte Expression von Fas beobachtet werden. [14] Andere Studien zeigen, dass bei einer Hypertrophie durch Volumenbelastung zwar auch eine Erhöhung der Expression von Fas beobachtet werden kann, jedoch programmierter Zelltod von Kardiomyozyten nicht über Fas induziert wird. [108] Die Möglichkeit, dass unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen die Induktion von apoptotischem Zelltod in Kardiomyozyten über Fas abläuft, kann aber nicht ausgeschlossen werden, da in Ratten- und Mausherzen ein Fas-induzierter programmierter Zelltod nach Ischämie/Reperfusion zu beobachten war. [38]

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass mechanische Dehnung in Ventrikelmyozyten apoptotische und nekrotische Zelluntergänge induzieren kann, der Weg des Zelltods aber wesentlich vom Lebensalter beeinflusst wird.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die im Alter größere Steifheit des Sarkolemm zu einer größeren Anfälligkeit für dehnungsinduzierte Membranschäden führen kann, was von einem Ionen- und Flüssigkeitseinstrom und der Auslösung nekrotischen Zelltods gefolgt wird. Auch altersbedingte Dysfunktionen der Mitochondrien können die Ausführung der ATP-abhängigen apoptotischen Signalkaskade verhindern.

Der dehnungsinduzierte Untergang von Myozyten aus Herzen junger Ratten wird vermutlich durch Steigerung der mitochondrialen Membranpermeabilität über den mitochondrialen Weg der Apoptoseinduktion vermittelt.

Zur Verhinderung von dehnungsinduziertem apoptotischen Zelltod wäre ein Eingreifen in die mitochondriale apoptotische Signalkaskade vorstellbar. Ein solches Eingreifen würde nur bei jungen Ratten den dehnungsinduzierten Untergang von Herzmuskelzellen verhindern können.

In Herzen alter Ratten wäre nur die Hemmung von dehnungsinduziertem nekrotischen Zelltod sinnvoll. Eine ähnliche Modulation wie bei apoptotischem Zelltod ist hier nicht möglich. Es ist jedoch gezeigt worden, dass altersbedingte

Veränderungen in der Zusammensetzung der Mitochondrien- und Plasmazellmembran ernährungsabhängig sind. So können altersbedingten Membranveränderungen durch Modifikation der Ernährung entgegengewirkt werden. [50, 62, 51] Es ist gezeigt worden, dass der präventive Wert einer Ernährungskontrolle zur Verhinderung von kardiovaskulären Ereignissen klein aber möglicherweise relevant ist. [35]

Die erhofften Ergebnisse dieser Arbeit über mechanisch-induzierte Apoptose und Nekrose in Abhängigkeit vom Alter sollten zur Suche nach den Ursachen altersbedingten Zellverlustes beitragen. Spätere Untersuchungen sollten zeigen, inwieweit die vorliegenden Ergebnisse unter in vivo Bedingungen und im humanen Myokard relevant sind.

6. Zusammenfassung

1. Mechanische Dehnung kann im Herzen sowohl apoptotische als auch nekrotische Zelluntergänge induzieren. Hier wurde gezeigt, dass der Weg in den mechanisch-induzierten Zelltod wesentlich vom Lebensalter beeinflusst wird.
2. Die Untersuchungen wurden an kultivierten Ventrikelmyozyten aus jungen und alten männlichen Ratten durchgeführt. Die jungen Ratten waren 3 Monate, die alten 14-24 Monate alt.
3. Isolierte Ventrikelmyozyten wurden für 24h auf Laminin-beschichteten Bioflex Kulturplatten angeheftet („Kultivierung“) und nachfolgend für 24h zyklisch (1Hz; 5% Elongation; Bioflex System) gedehnt. Als Kontrolle dienten ungedehnte Ventrikelmyozyten, die für 48h kultiviert worden waren.
4. Mit Hilfe des TUNEL wurde der Anteil der Myozyten bestimmt, die durch Apoptose spontan zugrunde gingen. Der Anteil apoptotischer Myozyten an der Gesamtzahl der untersuchten Myozyten betrug nach 48h Kultur $0,33\pm 0,12\%$ (MW \pm SD) bei jungen Ratten (n=7) und $1,05\pm 0,35\%$ (MW \pm SD) bei alten (n=11). Zyklische Dehnung steigerte den Anteil apoptotischer Zellen in Ventrikelmyozyten aus jungen Ratten signifikant, auf $0,58\pm 0,18\%$ (MW \pm SD), nahm jedoch keinen Einfluss auf die Zahl apoptotischer Ventrikelmyozyten in Zellen aus alten Ratten.
5. Für die Bestimmung des Ausmaßes nekrotischen Zelltodes wurden Färbungen zur Darstellung der Zellmembranintaktheit mit Propidiumjodid (PJ) und 5-hexadecanoylaminofluorescein (HEDAF), sowie die Messung der LDH-Aktivität eingesetzt. Zyklische mechanische Dehnung ließ den Anteil nekrotischer Ventrikelmyozyten bei jungen Ratten unbeeinflusst, steigerte aber den Anteil nekrotischer Ventrikelmyozyten bei alten Ratten signifikant.
6. In Ventrikelmyozyten alter Ratten wurden nach Dehnung $38,0\pm 6,4\%$ (MW \pm SD; n=9) PJ-markierte (Kontrolle $28,2\pm 6,0\%$) und $50,0\pm 13,3\%$ (MW \pm SD; n=9) HEDAF-markierte (Kontrolle $34,6\pm 6,5\%$) Myozyten gefunden. Die relative LDH-Aktivität stieg von $5,6\pm 1,2\%$ auf $8,4\pm 3,3\%$ (n=9) nach der Dehnung.
7. Bei Ventrikelmyozyten junger Ratten waren $30,7\pm 10,6\%$ (PJ; MW \pm SD; n=8) bzw. $35,7\pm 6,5\%$ (HEDAF; MW \pm SD; n=8) nach 48h Kultur nekrotisch. Nach Dehnung betragen die Werte $33,8\pm 12,8\%$ (PJ) bzw. $35,7\pm 7,7\%$ (HEDAF). Die relative LDH-Aktivität betrug $5,6\pm 1,4\%$ bzw. $5,6\pm 1,9\%$. Diese Unterschiede waren nicht signifikant. Zyklische mechanische Dehnung induziert Zelltod sowohl

in Ventrikelmyozyten aus jungen als auch aus alten Ratten. Der Weg in den Zelltod ist jedoch unterschiedlich. Ventrikelmyozyten aus jungen Ratten zeigen ausschließlich dehnungsinduzierte Steigerung der Apoptose, Ventrikelmyozyten aus alten Ratten ausschließlich dehnungsinduzierte Steigerung des nekrotischen Zelltods.

8. Es wird diskutiert, dass Ventrikelmyozyten aus alten Ratten die Fähigkeit verlieren, Signale, die durch mechanischen Stress (zyklische Dehnung) induziert werden, mit Apoptose zu beantworten. Als mögliche Ursachen werden die im Alter größere Steifheit des Sarkolemms (größere Anfälligkeit auf Dehnungsinduzierte Membranschäden mit nachfolgendem Ca^{2+} -Einstrom) sowie eine unzureichende ATP-Synthese aufgrund altersbedingter mitochondrialer Dysfunktion diskutiert.

7. Literatur

- 1 Algeciras-Schimnich A, Shen L, Barnhart B, Murmann A, Burkhardt J, Peter M: Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* 22 (2002) 207-220
- 2 Anversa P, Hiler B, Ricci R, Guideri G, Olivetti G: Myocyte cell loss and myocyte hypertrophy in the aging rat heart. *J Am Coll Cardiol* 8 (1986) 1441-1448
- 3 Aoki H, Kang P, Hampe J, Yoshimura K, Noma T, Matsuzaki M, Izumo S: Direct activation of mitochondrial apoptosis machinery by c-Jun N-terminal kinase in adult cardiac myocytes. *J Biol Chem* 277 (2002) 10244-10250
- 4 Armstrong S, Ganote C: Effects of the protein phosphatase inhibitors okadaic acid and calyculin A on metabolically inhibited and ischaemic isolated myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 24 (1992) 869-884
- 5 Armstrong S, Ganote C: Flow cytometric analysis of isolated adult cardiomyocytes: vinculin and tubulin fluorescence during metabolic inhibition and ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 24 (1992) 149-162
- 6 Bartling B, Milting H, Schumann H, Darmer D, Arusoglu L, Koerner M, El-Banayosy A, Koerfer R, Holtz J, Zerkowski H: Myocardial gene expression of regulators of myocyte apoptosis and myocyte calcium homeostasis during hemodynamic unloading by ventricular assist devices in patients with end-stage heart failure. *Circulation* 100 (1999) 216-223
- 7 Bogoyevitch M, Gillespie-Brown J, Ketterman A, Fuller S, Ben-Levy R, Ashworth A, Marshall C, Sugden P: Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. *Circ Res* 79 (1996) 162-173
- 8 Boldin M, Mett I, Varfolomeev E, Chumakov I, Shemer-Avni Y, Camonis J, Wallach D: Self-association of the "Death Domains" of the p55 Tumor Necrosis Factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/Apo1 effects. *J Biol Chem* 270 (1995) 387-391

-
- 9 Bossy-Wetzell E, Newmeyer D, Green D: Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *The EMBO Journal* 17 (1998) 37-49

 - 10 Bradham C, Qian T, Streetz K, Trautwein C, Brenner D, Lemaster J: The mitochondrial permeability transition is required for Tumor Necrosis Factor α -mediated apoptosis and cytochrome c release. *Mol Cell Biol* 18 (1998) 6353-6364

 - 11 Breithardt G, Borggrefe M, Budde T, Schwammenthal E, Wichter T: Das Herz bei anderen Erkrankungen. In: Schettler G, Greten H (Hrsg): *Innere Medizin*. Georg Thieme, Stuttgart, New York 1998, S.163-168

 - 12 Buselmaier W: *Biologie für Mediziner* 7. Auflage Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York usw., 1994

 - 13 Capasso J, Malhotra A, Remily R, Scheuer J, Sonnenblick E: Effects of age on mechanical and electrical performance of rat myocardium. *Am. J. Physiol.* 245 (1983) H72-H81

 - 14 Cheng W, Li B, Kajstura J, Li P, Wolin M, Sonnenblick E, Hintze T, Olivetti G, Anversa P: Stretch-induced programmed myocyte cell death. *J. Clin. Invest.* 96 (1995) 2247-2259

 - 15 Chinnaiyan A, Tepper C, Seldin M, Rourke K, Kischkel F, Hellbardt S, Krammer P, Peter M, Dixit V: FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/Apo-1) and Tumor Necrosis Factor Receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 4961-4965

 - 16 Clerk A, Michael A, Sugden P: Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, HSP25/27, in neonatal ventricular myocytes. *Biochem J* 333 (1998) 581-589

 - 17 Connolly K, Cho Y, Duan R, Fikes J, Gregorio T, LaFleur D, Okoye Z, Salcedo T, Santiago G, Ullrich S, Wei P, Windle K, Wong E, Yao X, Zhang Y, Zheng G,

-
- Moore P: In vivo inhibition of Fas ligand-mediated killing by TR6, a Fas ligand decoy receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 298 (2001) 25-33
- 18 Daugas E, Susin S, Zamzami N, Ferri K, Irinopoulou T, Larochette N, Prévost M, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer: Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J* 14 (2000) 729-739
- 19 de Murcia J, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver F, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Walztinger C, Chambon P: Requirement of poly(ADP-ribose)polymerase in recovery from DNA damage in mice and cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997) 7303-7307
- 20 Ding H, Lin Y, McGill G, Juo P, Zhu H, Blenis J, Yuan J, Fisher D: Essential role for Caspase-8 in transcription-independent apoptosis triggered by p53. *J Biol Chem* 275 (2000) 38905-38911
- 21 Esposito L, Melov S, Panov A, Cottrell B, Wallace D: Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999) 4820-4825
- 22 Feuerstein G, Ruffolo R, Yue T: Apoptosis and congestive heart failure. *TCM* 7 (1997) 249-255
- 23 Gogvadze V, Robertson J, Zhivotovski B, Orrenius S: Cytochrome c release occurs via Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent mechanisms that are regulated by Bax. *J Biol Chem* 276 (2001) 19066-19071
- 24 Greger R: Die Zelle als Grundbaustein. In: Klinker R, Silbernagl S (Hrsg): *Lehrbuch der Physiologie*. Georg Thieme, Stuttgart, New York 1996, S.13-36
- 25 Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G, Lavoie J, Huot J, Landry J: Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Sci* 110 (1997) 357-368

-
- 26 Guerra S, Leri A, Wang X, Finato N, Di Loreto C, Beltrami C, Kajstura J, Anversa P: Myocyte death in the failing human heart is gender dependent. *Circ Res.* 85 (1999) 856-866
- 27 Ha H, Snyder S: Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999) 13978-13982
- 28 Hagen T, Moreau R, Suh J, Visioli F: Mitochondrial decay in the aging rat heart. Evidence for improvement by dietary supplement with Acetyl-L-Carnitine and/or Lipoic Acid. *Ann N Y Acad Sci* 959 (2002) 491-507
- 29 Harper M, Monemdjou S, Ramsey J, Weindruch R: Age-related increase in mitochondrial proton leak and decrease in ATP turnover reactions in mouse hepatocytes. *Am J Physiol* 275 (1998) E197-E206
- 30 Haworth R, Hunter D, Berkoff H: Contracture in isolated adult rat heart cells. Role of Ca²⁺, ATP, and compartmentation. *Circ Res* 49 (1981) 1119-1128
- 31 Hayakawa M, Sugiyama S, Hattori K, Takasawa M, Ozawa T: Age-associated damage in mitochondrial DNA in human hearts. *Mol Cell Biochem* 119 (1993) 95-103
- 32 Hengartner M: The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407 (2000) 770-776
- 33 Herceg Z, Wang Z: Failure of Poly(ADP-Ribose) Polymerase cleavage by caspases leads to induction of necrosis and enhanced apoptosis. *Mol Cell Biol* 19 (1999) 5124-5133
- 34 Heymes C, Silvestre J, Llorens-Cortes C, Marotte F, Chevalier B, Levy B, Swynghedauw B, Samuel J: Cardiac senescence is associated with enhanced expression of Angiotensin II receptor subtypes. *Endocrinology* 139 (1998) 2579-2587
- 35 Hooper L, Summerbell C, Higgins J, Thomson R, Capps N, Smith G, Riemersma R, Ebrahim S: Dietary fat intake and prevention of cardiovascular disease: systematic review. *BMJ* 322 (2001) 757-763

-
- 36 Husse B, Sopart A, Isenberg G: Cyclical mechanical stretch induced apoptosis in myocytes from young rats but necrosis in myocytes from old rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285 (2003) im Druck
- 37 Isenberg G, Kazanski V, Kondratev D, Gallitelli M, Kiseleva I, Kamkin A: Differential effects of stretch and compression on membrane currents and $[Na^+]_i$ in ventricular myocytes. *Prog Biophys Mol Biol* 82 (2003) 43-56
- 38 Isenberg G, Klockner U: Calcium-tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium". *Pflügers Arch* 395 (1982) 6-18
- 39 Jeremias I, Kupatt C, Martin-Villalba A, Habazettl H, Schenkel J, Boekstegers P, Debatin K: Involvement of CD95/Apo1/ Fas in cell death after myocardial ischemia. *Circulation* 102 (2000) 915-920
- 40 Jiang X, Wang X: Cytochrome c promotes Caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem* 275 (2000) 31199-31203
- 41 Jürgensmeier J, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed John: Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *PNAS* 95 (1998) 4997-5002
- 42 Kajstura J, Cheng W, Sarangarajan R, Li P, Li B, Nitahara J, Chapnick S, Reiss K, Olivetti G, Anversa P: Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fischer 344 rats. *Am. J. Physiol.* 271 (1996) H1215-H1228
- 43 Kajstura J, Cigola E, Malhotra A, Li P, Cheng W, Meggs L, Anversa P: Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol* 29 (1997) 859-870
- 44 Kang P, Haunstetter A, Aoki H, Usheva A, Izumo S: Morphological and molecular characterization of adult cardiomyocyte apoptosis during hypoxia and reoxygenation. *Circ. Res.* 87 (2000) 118-125
- 45 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. *Circulation* 99 (1999) 2757-2764
- 46 Kato S, Takemura G, Maruyama R, Aoyama T, Hayakawa K, Koda M, Kawase Y, Li Y, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H: Apoptosis, rather than oncosis, is the predominant mode of spontaneous death of isolated adult rat cardiac myocytes in culture. *Jpn Circ J* 65 (2001) 743-748
- 47 Kirshenbaum L, de Moissac D: The bcl-2 gene product prevents programmed cell death of ventricular myocytes. *Circulation* 96 (1997) 1580-1585
- 48 Kluck R, Bossy-Wetzell E, Green D, Newmeyer D: The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275 (1997) 1132-1136
- 49 Komuro I, Kudo S, Yamazaki T, Zou Y, Shiojima I, Yazaki Y: Mechanical stretch activates the stress-activated protein kinases in cardiac myocytes. *FASEB J* 10 (1996) 631-636
- 50 Lee J, Yu B, Herlihy T: Modulation of cardiac mitochondrial membrane fluidity by age and calorie intake. *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 260-265
- 51 Lemaitre R, King I, Mozaffarian D, Kuller L, Tracy R, Siscovick D: n-3 Polyunsaturated fatty acids, fatal ischemic heart disease, and nonfatal myocardial infarction in older adults: The Cardiovascular Health Study. *Am J Clin Nutr* 77 (2003) 279-280
- 52 Lembo G, Trimarco B, Roncarati R, Rienzo A, Sgaramella G, Farina F, Notte A, Stassi G, Morisco C, Condorelli G: Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and bcl-2 during left ventricular adaptations to chronic pressure overload in the rat. *Circulation* 99 (1999) 3071-3078
- 53 Leonhardt H: *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen* 8.Auflage Thieme Verlag, Stuttgart New York, 1990

-
- 54 Leri A, Claudio P, Li Q, Wang X, Reiss K, Wang S, Malhotra A, Kajstura J, Anversa P: Stretch-mediated release of Angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local Renin-angiotensin system and decreases the bcl-2-to-bax protein ratio in the cell. *J Clin Invest* 101 (1998) 1326-1342
- 55 Leri A, Fiordaliso F, Setoguchi M, Limana F, Bishopric N, Kajstura J, Webster K, Anversa P: Inhibition of p53 function prevents Renin-Angiotensin System activation and stretch-mediated myocyte apoptosis. *Am. J. Pathol.* 157 (2000) 843-857
- 56 Leri A, Liu Y, Claudio P, Kajstura J, Wang X, Wang S, Kang P, Malhotra A, Anversa P: Insulin-like Growth Factor-1 induces Mdm2 and down-regulates p53, attenuating the myocyte Renin-Angiotensin System and stretch mediated apoptosis. *Am J Pathol* 154 (1999) 567-580
- 57 Leri A, Liu Y, Li B, Fiordaliso F, Malhotra A, Latini R, Kajstura J, Anversa P: Up-regulation of AT1 and AT2 receptors in postinfarcted hypertrophied myocytes and stretch-mediated apoptotic cell death. *Am J Pathol* 156 (2000) 1663-1672
- 58 Levrant J, Iwase H, Shao Z, Vanden Hoek T, Schumacker P: Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284 (2003) 549-558
- 59 Li P, Dietz R, von Harsdorf R: p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by bcl-2. *EMBO J* 18 (1999) 6027-6036
- 60 Li Q, Li B, Wang X, Leri A, Kumar J, Liu Y, Kajstura J, Baserga R, Anversa P: Overexpression of Insulin-like Growth Factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 100 (1997) 1991-1999
- 61 Li Z, Bing O, Long X, Robinson K, Lakatta E: Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol* 272 (1997) H2313-H2319

-
- 62 Liu L, Azhar G, Gao W, Zhang X, Wei J: Bcl-2 and Bax expression in adult rat hearts after coronary occlusion: age-associated differences. *Am J Physiol* 275 (1998) R315-R322
- 63 Lorenzini A, Bordoni A, Spano C, Turchetto E, Biagi P, Hrelia S: Age-related changes in essential fatty acid metabolism in cultured rat heart myocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 57 (1997) 143-147
- 64 Malhotra R, Sadoshima J, Brosius F, Izumo S: Mechanical stretch and Angiotensin II differentially upregulate the Renin-Angiotensin System in cardiac myocytes in vitro. *Circ Res.* 85 (1999) 137-146
- 65 Maruyama R, Takemura G, Aoyama T, Hayakawa K, Koda M, Kawase Y, Qiu X, Ohno Y, Minatoguchi S, Miyata K, Fujiwara T, Fujiwara H: Dynamic process of apoptosis in adult rat cardiomyocytes analyzed using 48-hour videomicroscopy and electron microscopy. *Am J Pathol* 159 (2001) 683-692
- 66 Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin S, Beutner G, Brdiczka D, Rémy R, Xie Z, Reed J, Kroemer G: The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J. Exp. Med.* 187 (1998) 1261-1271
- 67 Medema J, Scaffidi C, Kischkel F, Shevchenko A, Mann M, Krammer P, Peter M: FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* 16 (1997) 2794-2804
- 68 Miro O, Casademont J, Casals E, Perea M, Urbano-Marquez A, Rustin P, Cardellach F: Aging is associated with increased lipid peroxidation in human hearts, but not with mitochondrial respiratory chain enzyme defects. *Cardiovasc Res* 47 (2000) 624-631
- 69 Nikolaus T, Zahn R: Alter und Altern. In: Schmidt R, Thews G (Hrsg): *Physiologie des Menschen*. Springer, Berlin, Heidelberg 1997 S.708-716
- 70 Nishikawa T, Ishiyama S, Nagata M, Sakomura Y, Nakazawa M, Momma K, Hiroe M, Kasajima T: Programmed cell death in the myocardium of

- arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in children and adults. *Cardiovasc Pathol* 8 (1999) 185-189
- 71 Nitahara J, Cheng W, Liu Y, Li B, Leri A, Li P, Mogul D, Gambert S, Kajstura J, Anversa P: Intracellular Calcium, DNase activity and myocyte apoptosis in aging Fischer 344 rats. *J Mol Cell Cardiol* 30 (1998) 519-535
- 72 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. *Circulation* 98 (1998) 1422-1430
- 73 Olivetti G, Giordano G, Corradi D, Melissari M, Lagrasta C, Gambert S, Anversa P: Gender differences and aging: effects on the human heart. *J Am Coll Cardiol* 26 (1995) 1068-1079
- 74 Olivetti G, Melissari M, Capasso J, Anversa P: Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circ Res* 68 (1991) 1560-1568
- 75 Olivetti G, Quaini F, Sala R, Lagrasta C, Corradi D, Bonacina E, Gambert S, Cigola E, Anversa P: Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *J Mol Cell Cardiol* 28 (1994) 2005-2016
- 76 Otter I, Conus S, Ravn U, Rager M, Olivier R, Monney L, Fabbro D, Borner C: The binding properties and biological activities of bcl-2 and bax in cells exposed to apoptotic stimuli. *J Biol Chem* 273 (1998) 6110-6120
- 77 Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan A, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit V: The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276 (1997) 111-113
- 78 Papoff G, Cascino I, Eramo A, Starace G, Lynch D, Ruberti G: An N-terminal domain shared by Fas/Apo-1 (CD95) soluble variants prevents cell death in vitro. *J Immunol* 156 (1996) 4622-4630

-
- 79 Pastorino J, Chen S, Tafani M, Snyder J, Farber J: The overexpression of bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 273 (1998) 7770-7775
- 80 Peiper U: Muskulatur In: Klinker R, Silbernagl S (Hrsg): Lehrbuch der Physiologie. Thieme Verlag Stuttgart New York 1996, S.79-104
- 81 Pfeifer U, Gullotta F: Zell- und Gewebsschäden. In: Grundmann E (Hrsg): Einführung in die Allgemeine Pathologie. Urban & Fischer, München, Jena 1994, S.21-36
- 82 Phaneuf S, Leewenburgh C: Cytochrome c release from mitochondria in the aging heart: a possible mechanism for apoptosis with age. *Am J Physiol* 282 (2001) R423-R430
- 83 Pimentel D, Amin J, Xiao L, Miller T, Viereck J, Oliver-Krasinski J, Baliga R, Wang J, Siwik D, Singh K, Pagano P, Colluci W, Sawyer D: Reactive Oxygen Species mediate amplitude-dependent hypertrophic and apoptotic responses to mechanical stretch in cardiac myocytes. *Circ Res* 89 (2001) 453-60
- 84 Pinsky D, Aji W, Szaboles M, Athan E, Liu Y, Yang Y, Kline R, Olson K, Cannon P: Nitric oxide triggers programmed cell death (apoptosis) of adult ventricular myocytes in culture. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 277 (1999) H1189-H1199
- 85 Piper H, Schwartz P, Spahr R, Hutter J, Spieckermann P: Anoxic injury of adult cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol* 80 (1985) 37-41
- 86 Rayment N, Haven A, Madden B, Murday A, Trickey R, Shipley M, Davies M, Katz D: Myocyte loss in chronic heart failure. *J. Pathol.* 188 (1999) 213-219
- 87 Roessner A: Grundlagen zur Pathologie des Kreislaufs. In: Grundmann E (Hrsg): Einführung in die Allgemeine Pathologie. Urban & Fischer, München, Jena 1994, S. 195-221

-
- 88 Roy N, Deveraux Q, Takahashi R, Salvesen G, Reed J: The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific Caspases. *EMBO J* 16 (1997) 6914-6925
- 89 Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki L.: Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 95 (1997) 320-323
- 90 Saraste A, Pulkki K, Voipio-Pulkki L: Significance of myocytes with positive DNA in Situ Nick End-Labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 101 (2000) e239
- 91 Scaffidi C, Schmitz I, Krammer P, Peter M: The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274 (1999) 1541-1548
- 92 Scheubel R, Bartling B, Stein S, Darmer D, Holtz J, Pregla R, Hetzer R, Koerfer R, Zerkowski H, Silber R: Age-dependent myocardial reinduction of apoptosis inhibitors under VAD in heart failure. *Thorac Cardiovasc Surg* 49 (2001) 268-272
- 93 Schneider P, Holler N, Bodmer J, Hahne M, Frei K, Fontana A, Tschopp J: Conversion of membrane-bound Fas(CD95) Ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med* 187 (1998) 1205-1213
- 94 Schrader J: Das Herz. In: Klinke R, Silbernagl S (Hrsg): *Lehrbuch der Physiologie*. Georg Thieme, Stuttgart, New York 1996, S.105-138
- 95 Schuler M, Bossy-Wetzel E, Goldstein J, Fitzgerald P, Green D: p53 induces apoptosis by Caspase activation through mitochondrial Cytochrome c release. *J Biol Chem* 275 (2000) 7337-7342
- 96 Shiraishi J, Tatsumi T, Keira N, Akashi K, Mano A, Yamanaka S, Matoba S, Asayama J, Yaoi T, Fushiki S, Fliss H, Nakagawa M: Important role of energy-dependent mitochondrial pathways in cultured rat cardiac myocyte apoptosis. *Am J Physiol. Heart Circ Physiol* 281 (2001) H1637-H1647
- 97 Slee E, Harte M, Kluck R, Wolf B, Casiano C, Newmeyer D, Wang H, Reed J, Nicholson D, Alnemri E, Green D, Martin S: Ordering the Cytochrome c-initiated

- Caspase-cascade: hierarchial activation of Caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a Caspase-9- dependent manner. *J Cell Biol* 144 (1999) 281-292
- 98 Stegh A, Hermann H, Lampel S, Weisenberger D, Andrä K, Seper M, Wiche G, Krammer P, Peter M: Identification of the Cytolinker Plectin as a major early in vivo substrate for Caspase 8 during CD95- and Tumor Necrosis Factor Receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 20 (2000) 5665-5679
- 99 Stennicke H, Jürgensmeier J, Shin H, Deveraux Q, Wolf B, Yang X, Zhou Q, Ellerby M, Ellberby L, Bredesen D, Green D, Reed J, Froelich C, Salvesen G: Pro-caspase-3 is a major physiologic target of Caspase-8. *J Biol Chem* 273 (1998) 27084-27090
- 100 Susin S, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri K, Irinopoulou T, Prévost M, Brothers G, Mak T, Penninger J, Earnshaw W, Kroemer G: Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 192 (2000) 571-580
- 101 Susin S, Lorenzo H, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prévost M, Alzari P, Kroemer G: Mitochondrial release of Caspase-2 and -9 during apoptotic process. *J. Exp. Med.* 189 (1999) 381-394
- 102 Takasawa M, Hayakawa M, Sugiyama S, Hattori K, Ito T, Ozawa T: Age-associated damage in mitochondrial function in rat heart. *Exp Gerontol* 28 (1993) 267-280
- 103 Takashi E, Ashraf M: Pathologic assessment of myocardial cell necrosis and apoptosis after ischemia and reperfusion with molecular and morphological markers. *J Mol Cell Cardiol* 32 (2000) 209-224
- 104 Uchiyama T, Otani H, Okada T, Ninomiya H, Kido M, Imamura H, Nogi S, Kobayashi Y: Nitric oxide induces caspase-dependent apoptosis and necrosis in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 34 (2002) 1049-1961
- 105 Vogel M: Zellersatz. In: Grundmann E (Hrsg): Einführung in die Allgemeine Pathologie. Urban & Fischer, München, Jena 1994, S. 142-151

-
- 106 Von Harsdorf R, Li P, Dietz R: Signaling pathways in reactive oxygen-species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation* 99 (1999) 2934-2941
- 107 Wang L, Ma W, Markovich R, Chen J, Wang P: Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by Insulin-like growth factor 1. *Circ Res* 83 (1998) 516-522
- 108 Wollert K, Heineke J, Westermann J, Lüdde M, Fiedler B, Zierhut W, Laurent D, Bauer M, Schulze-Osthoff K, Drexler H: The cardiac Fas (APO-1/CD95) receptor/Fas ligand system relation to diastolic wall stress in volume-overload hypertrophy in vivo and activation of the transcription factor AP-1 in cardiac myocytes. *Circulation* 101 (2000) 1172-1178
- 109 Yamamura T, Otani H, Nakao Y, Hattori R, Osako M, Imamura H: IGF-I differentially regulates Bcl-xL and Bax and confers myocardial protection in the rat heart. *Am J Physiol* 280 (2001) H1191-H1200
- 110 Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim C, Ibrado A, Cai J, Peng T, Jones D, Wang X: Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275 (1997) 1129-1132
- 111 Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y: Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by caspase inhibitor. *Circulation* 97 (1998) 276-281
- 112 Yeh W, de la Pompa J, McCurrach M, Shu H, Elia A, Shahinian A, Ng M, Wakeham A, Khoo W, Mitchell K, El-Deiry W, Lowe S, Goeddel D, Mak T: FADD: Essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* 279 (1998) 1944-1958
- 113 Yue T, Wang L, Gu J, Ma X, Kumar S, Lee J, Feuerstein G, Thomas H, Maleeff B, Ohlstein E: Inhibition of Extracellular signal-regulated kinase enhances ischemia/reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. *Circ Res* 86 (2000) 692-699

-
- 114 Zeng T, Glenna C, Bett L, Sachs F: Stretch-activated whole cell currents in adult rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278 (2000) 548-557
- 115 Zha H, Aimé-Sempé C, Sato T, Reeds J: Proapoptotic protein bax heterodimerizes with bcl-2 and homodimerizes with bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J Biol Chem* 271 (1996) 7440-7444
- 116 Zou H, Li Y, Liu X, Wang X: An APAF-1-Cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates Procaspase-9. *J Biol Chem* 274 (1999) 11549-11556

8. Thesen

1. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass der Alterungsprozess von Tier und Mensch mit einem Verlust von Kardiomyozyten einhergeht. Ein Verlust von Myozyten trägt zur Verschlechterung der Funktion des Myokards bei, was eine folgenschwere Veränderung für den gesamten Organismus darstellt. Diese Arbeit soll einen Beitrag zur Identifizierung der Mechanismen leisten, die zu einem altersbedingten Zellverlust führen.
2. Myozyten können über den Weg des nekrotischen und des apoptotischen Zelltodes zugrunde gehen.
3. Verlust von Myozyten führt zu erhöhter Belastung der verbliebenen Zellen.
4. Spontane Apoptose ist in kultivierten Ventrikelmyozyten alter Ratten in größerem Ausmaß zu finden als in Ventrikelmyozyten junger Ratten.
5. Zyklische mechanische Dehnung induziert den apoptotischen Zelltod in kultivierten Ventrikelmyozyten aus Herzen junger Ratten.
6. Dehnungsinduzierter programmierter Zelltod kann in Kulturen von Ventrikelmyozyten alter Ratten nicht gefunden werden.
7. Das Ausmaß spontanen nekrotischen Zelltodes in kultivierten Ventrikelmyozyten zeigt keine altersabhängigen Unterschiede.
8. In kultivierten Ventrikelmyozyten aus Herzen alter Ratten induziert mechanische Dehnung nekrotischen Zelltod.
9. Induktion von nekrotischem Zelltod durch Dehnung findet in kultivierten Ventrikelmyozyten aus Herzen junger Ratten nicht statt.
10. Zukünftige Untersuchungen sollten zeigen, inwieweit die vorliegenden Ergebnisse

unter in vivo Bedingungen und im humanen Myokard relevant sind und welche Mechanismen dem zugrunde liegen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Antje Sopart

Anschrift: Weidenstr. 3

39114 Magdeburg

Telefon: 0391-5556263

Geboren am: 11. März 1977 in Schönebeck/Elbe

Eltern: Dr. Sigrid Sopart geb.Peschel (Zahnärztin)

Dr. Hans-Joachim Sopart (Facharzt für Urologie)

Staatsbürgerschaft: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung und Studium

Sept. 1983 – Aug. 1987 Besuch der Grundschule Pretzien

Sept. 1987 – Aug. 1991 Besuch der Polytechnischen Oberschule in Gommern

Sept. 1991 – Juni 1995 Besuch des Norbertusgymnasiums in Magdeburg

Abschluss: Abitur

Juli 1995 – Juli 1996 Teilnahme am Austauschprogramm „Ein Schuljahr
im Ausland“ in Wilmington, NC USA

Okt. 1996 – Okt. 2001 Studium der Zahnmedizin an der

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

25.10.2001 Staatsexamen

29.11.2001 Erhalt der Approbation als Zahnärztin

Berufstätigkeit

seit Januar 2002 Tätigkeit als Assistenz Zahnärztin in der
Zahnarztpraxis Dr. Sigrid Sopart

Magdeburg, den 6.8.2003

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Verfahren, Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Magdeburg, den 6.8.2003

Antje Sopart

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Magdeburg, den 6.8.2003

Antje Sopart

Hinweis auf Publikation von Ergebnissen der Dissertation

Husse B, Sopart A, Isenberg G: Cyclical mechanical stretch induced apoptosis in myocytes from young rats but necrosis in myocytes from old rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285 (2003) H

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. G. Isenberg und Frau Dr. B. Husse für die Überlassung des Themas sowie die umfassende Betreuung und freundliche Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit.