"MECHANISCHE DEHNUNG ALS URSACHE DER ÜBERLAST-ASSOZIIERTEN Apoptose im terminal insuffizienten Myokard: potentielle klinische Bedeutung"

elektronisches dokument

Dissertation

ULB Sachsen-Anhalt

Zur Erlangung des akademischen Grades *doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Heike Schumann geb. am 09. Dezember 1970 in Schmölln

Gutachter:

Prof. Dr. J. Holtz
Prof. Dr. K. Neubert

3. Prof. Dr. T. Eschenhagen

Halle (Saale), den 27.10.2000

INHALTSVERZEICHNIS

Г	NHALTS	VERZEICHNIS	Ι
A	BKÜRZ	UNGSVERZEICHNIS	IV
1	EINI	LEITUNG	1
	1.1	Kompensatorische Herzhypertrophie und dekompensiertes Herzversagen	1
	1.2	Apoptose versus Nekrose	2
	1.3	Myokardiale Apoptose	3
	1.4	Apoptose auslösende Rezeptoren mit intrazellulärer "Death Domain" (Todesdomäne) und	
		ihre Liganden	5
	1.5	Signalübertragung von Apoptose über "Death Domain"-Rezeptoren	6
	1.6	Modulation der Apoptoseauslösung über "Death Domain"-Rezeptoren durch Antagonisten	7
	1.7	Mitochondriale Auslösung von Apoptose	9
	1.8	Aufgabenstellung	11
2	MAJ	TERIAL	12
	2.1	Humanes Herzgewebe	12
	2.2	Tierisches Myokardgewebe und neonatale Rattenkardiomyozyten	12
	2.3	Kultivierung von rechtsventrikulären Trabekeln aus Kaninchenherzen	13
	2.4	Bakterienstämme	15
	2.5	Vektoren	15
	2.6	Geräte und Chemikalien	15
3	МЕТ	THODEN	16
	3.1	Isolierung von Nukleinsäuren	16
	3.1.1	Präparation von Gesamt-RNA	16
	3.1.2	Isolierung genomischer DNA	17
	3.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA	18
	3.1	1.3.1Kultivierung von Bakterien	18
	3.1	1.3.2 Plasmid-Mini-Präparation	18
	3.1	1.3.3 Plasmid-Midi-Präparation	18
	3.2	Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren	18
	3.2.1	Konzentrationsbestimmung	18
	3.2.2	Agarosegelelektrophorese	18
	3.2.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	19
	3.2.4	Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren	19
	3.2.5	Restriktionsansätze	19
	3.2.6	Reverse Transkriptions-Polymerasekettenrektion (RT-PCR)	19
	3.2.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	21
	3.2.8	Sequenzierung	21

	3.3 K	ompetitive Standard kalibrierte RT-PCR	22
	3.3.1	Herstellung eines RNA-Standards	24
	3.3.2	Bestimmung der geeigneten Standardkonzentration	27
	3.3.3	Durchführung der Standard kalibrierten kompetitiven RT-PCR	27
	3.3.4	Densitometrische Auswertung	27
	3.4 N	achweis von Apoptose	28
	3.4.1	DNA-Leiter-Assay	28
	3.4.2	In situ-Nachweis von Apoptose durch TUNEL (terminal dUTP nick end labeling)	29
	3.4.2	1 Fixierung und Einbettung von Gewebestücken, Anfertigung von Gewebeschnitten	29
	3.4.2	.2 Anfertigung und Fixierung von Kryoschnitten	29
	3.4.2	.3 Standard-Protokoll zur TUNEL-Färbung	29
	3.5 W	Vestern-Blot-Analysen	30
	3.5.1	Isolierung von Gesamt-Protein aus Myokardproben	30
	3.5.2	Messung der Proteinkonzentration	30
	3.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	31
	3.5.4	Übertragung der Proteine auf Nitrocellulose und Anfärbung mit Ponceau S	31
	3.5.5	Coomassie-Färbung von PAA-Gelen	31
	3.5.6	Immunfärbung mit einem spezifischen Antikörper	32
	3.6 Ir	e Situ RT-PCR	32
	3.6.1	Primerdesign	32
	3.6.2	Vorbereitung der Schnitte	34
	3.6.3	In Situ RT-PCR (Amplifizierung eines spezifischen Fragmentes)	34
	3.6.4	PRINS (Primed in situ labeling) zur Detektion der PCR-Produkte	35
	3.6.5	Detektion der DIG-markierten DNA nach PRINS	36
4	ERGE	BNISSE	37
	4.1 E	xpression des Apoptose auslösenden Fas-Rezeptors und seiner Isoformen im humanen Myoka	ard37
	4.1.1	Erhöhte mRNA-Expression des Fas-Rezeptors im humanen rechten Atrium (RA) mit	
		zunehmendem Schweregrad der Herzinsuffizienz	37
	4.1.2	Detektion der mRNA löslicher Fas-Isoformen im humanen linksventrikulären Myokard	
		mittels RT-PCR	38
	4.1.3	Untersuchung von Myokard anderer Spezies auf das Vorkommen von Fas-Isoformen	39
	4.1.4	Verringerte mRNA-Expression der antiapoptotischen Isoform FasExo6Del im terminal	
		insuffizienten, humanen linksventrikulären Myokard	40
	4.1.5	Die mRNA-Expression von Fas- und FasExo6Del im humanen linksventrikulären Mvokard	
		nach hämodynamischer Entlastung	43
	4.1.6	Kardiomvozyten exprimieren Fas und dessen Isoform FasExo6Del	45
	4.1.6	.1 Test der Primer	45
	4.1.6	.2 Detektion der Fas-mRNA in Kardiomyozyten	47
	4.1.7	Untersuchungen zur Proteinexpression des Fas-Rezeptors im humanen Myokard	49
	4.2 B	estimmung der Expression des Liganden TRAIL und seiner Rezeptoren im humanen	

7	LITI	ERATUR	98
6	ZUS	AMMENFASSUNG	96
	5.2	Apoptose im Modellsystem kultivierter Kaninchentrabekel	91
		Myokard exprimiert?	89
	5.1.6	Sind die Komponenten des apoptotischen Signalweges der DD-Rezeptoren im	
		der Herzinsuffizienz?	87
	5.1.5	Wie verändert sich die Expression von Komponenten des TRAIL-Systems bei	
	5.1.4	Spielt alternatives Spleißen bei der Auslösung von Apoptose eine Rolle?	86
		nach mechanischer Entlastung durch ein ventrikuläres Assist-System (VAD, Kunstherz)	83
	5.1.3	Myokardiale Apoptose und Expression des Fas-Rezeptors im humanen Myokard	
		der Herzinsuffizienz?	78
	5.1.2	Wie verändert sich die Expression des Apoptose auslösenden Fas-Rezeptors bei	
	5.1.1	Nachweis von Apoptose in den Myokardproben	75
	5.1	Untersuchungen im humanen insuffizienten Myokard	75
5	DISF	KUSSION	75
	4.5.4	Verminderte mRNA-Expression von bel- x_L in den Kaninchentrabekeln nach Dehnung	71
	4.5.3	Variable Dehnung und Apoptose in den kultivierten Trabekeln	70
	4.5.2	Apoptose in isolierten, gedehnten Trabekeln in Kultur über 48 h	66
	4.5.1	Muskelphysiologische Parameter der Trabekel über 48h	66
		Kaninchentrabekeln	65
	4.5	Untersuchungen zur Apoptose im System der Langzeitkultur von rechtsventrikulären	
		mit der im Gewebe	64
	4.4.5	Vergleich der Apoptosehäufigkeit von isolierten Kardiomyozyten der Ratte in Kultur	
		TUNEL-Methode	63
	4.4.4	Nachweis apoptotischer Zellen auf Gewebeschnitten von humanem Myokard mittels	
	4.4.3	Nachweis von Apoptose im RA	62
		nach hämodynamischer Entlastung durch ein VAD	61
	4.4.2	Abnahme des apoptotischen DNA-Leiterscores im insuffizienten linksventrikulären Myokard	
		Myokardproben durch Agarosegelelektrophorese von genomischer DNA	59
	4.4.1	Bestimmung des apoptotischen DNA-Leiterscores in humanen linksventrikulären	
	4.4	Nachweis von Apoptose im humanen Myokard	59
		apoptotischen Signalkaskade der "Death Domain"-Rezeptoren im humanen Myokard	55
	4.3	Analyse der mRNA-Expression von TNF-RI, FasL sowie bekannter Komponenten der	
		insuffizienten linken Ventrikel erhöht	53
	4.2.2	Die Proteinexpression des Apoptose auslösenden Liganden TRAIL ist im terminal	í
	4.2.1	mRNA-Expression der Rezeptoren DR4, DR5 und DcR1 und dessen Liganden TRAIL	50
		linksventrikulären Myokard	50

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniuimpersulfat
A _x	Absorption bei einer Wellenlänge von x nm
BCA	Bicinchoninic Acid
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-indolylphosphat
bcl	B Cell Lymphoma
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
С	Cytosin
ca.	zirka
cDNA	copy DNA
d	Tag(e)
DAB	Diaminobenzidin
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DD	death domain
DED	Death Effector Domain
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-triphosphat
DR	"death"-Rezeptor
DTT	Dithiothreitol
dUTP	2'-Desoxy-Uracil-5'-Triphosphat
E. coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fas	Fs7 associated surface protein
FasL	Fas Ligand
G	Guanin
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTC	Guanidinisothiocyanat
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-Ttiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
LB	Luria-Bertani
LV	Linker Ventrikel
М	Molar [mol/l]
MCS	Multi Cloning Site

mRNA	messenger-RNA
NBT	Nitro-blau-tetrazolium
NYHA	New York Heart Association
OT	Objektträger
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Pikomol
RA	Rechtes Atrium
rel.	relative
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	RT mit anschließender PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standard Error of the Mean
Т	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
T _m	Schmelztemperatur
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
TSPE-Puffer	Tris-Sarcosyl-Phenol-EDTA-Puffer
TUNEL	terminal dUTP nick end labeling
U	Unit (Enzymeinheit)
Ü	Überstand
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
VS.	versus
w/v	Masse pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranosid

1 EINLEITUNG

1.1 Kompensatorische Herzhypertrophie und dekompensiertes Herzversagen

Das Herz-Kreislaufsystem übernimmt im Organismus wesentliche Versorgungs- und Transportfunktionen, es ermöglicht eine Verteilung von Substanzen und eine rasche Anpassung dieser Funktionen an einen unterschiedlichen Bedarf. Zentrales Element des geschlossenen Kreislaufsystems ist das Herz, durch dessen Pumpleistung das Blut von der venösen auf die arterielle Seite transportiert wird.

Ist das Herz trotz normalen Blutangebotes und normalen diastolischen Füllungsdruckes der Herzkammern nicht mehr in der Lage, den Stoffwechsel- und Funktionsbedürfnissen des Organismus nachzukommen, liegt eine Herzinsuffizienz vor. Die Ursachen für deren Entstehung liegen in einer Kontraktionsschwäche der Kammermuskulatur bedingt zum Beispiel durch einen Myokardinfarkt (Verlust von kontraktilem Gewebe), Koronarinsuffizienz (mangelnde Sauerstoffversorgung des Myokards), chronische Druck- oder Volumenbelastung (Hypertonie, Klappenfehler u.a.) oder durch Myokarditis (Entzündungen des Herzmuskels).

Initiale Kompensationsreaktionen auf derartige Myokardschwächen, ausgelöst durch die verminderte Auswurfleistung, führen zur reflektorischen Sympathikusaktivierung. Dies induziert zunächst eine arterielle Vasokonstriktion und Erhöhung des Venentonus. Dadurch wird der ventrikuläre Füllungsdruck gesteigert und so das zu niedrige Schlagvolumen trotz Myokardschwäche nahezu normalisiert. Auf diese Weise kann die Versorgung peripherer Organe aufrecht erhalten werden. Der kompensatorisch verstärkte Füllungsdruck bedingt jedoch eine chronisch erhöhte Wandspannung (mechanische Belastung, Dehnung) des Myokards, die zu einer Überlast-Hypertrophie der Kardiomyozyten führt (Holtz, 1992; Katz, 1990). Durch diese Hypertrophie wird die erhöhte Wandspannung durch die Zunahme des Kardiomyozytenquerschnittes teilweise wieder normalisiert. Das Herz erreicht damit trotz fortbestehender Myokardschwäche und reaktiver hämodynamischer Überlast einen Zustand der scheinbaren Kompensation. Als eine kritische Folge der Hypertrophie sind jedoch Phänotypveränderungen der Kardiomyozyten zu werten. Dies betrifft hauptsächlich die transmembranäre Signalübertragung von β-Adrenozeptoren, den kontraktilen Apparat (Annäherung an den fetalen Phänotyp, Dedifferenzierung), Enzyme des Energiestoffwechsels, sowie Elemente der Calcium-Homöostase (Mann et al., 1991). Die andauernde Erhöhung der neuroendrokrinen Aktivität (Sympathikus, Renin-Angiotensin-System) trägt zu diesen Veränderungen bei (Curtiss et al., 1978; Levine et al., 1982). Das Zusammenwirken dieser Anpassungsmechanismen und Phänotypveränderungen endet trotz zunächst erreichter Kompensation schließlich in einer Dekompensation und manifesten Herzinsuffizienz, die als Folgen der Dauerbelastung des Myokards betrachtet werden, ohne daß die Mechanismen dieser Dekompensation im Einzelnen geklärt wären (Eschenhagen und Weil, 1998; Holtz, 1993).

Während der Dekompensation des hypertrophierten Myokards erfolgt über die passive Dehnung hinaus zusätzlich eine "Gefügedilatation" der Herzkammer mit Neuanordnung der Myokardfasern, dies wird als "remodeling" bezeichnet (Anversa *et al.*, 1997). Dabei wurden Verluste an Myozyten beobachtet, die durch eine massive Akkumulation von Kollagen im interstitiellen Raum (Fibrosierung) ersetzt werden (Beltrami *et al.*, 1995), so daß die Kontraktionskraft zusätzlich negativ beeinflusst wird. Zunehmende Verluste an Kardiomyozyten führen zu einer weiteren massiven Belastung der verbleibenden Zellen. Als Folge dieses hypothetischen "Circulus vitiosus" versagt das Herz im Endstadium der Erkrankung vollständig.

Mechanismen, die den Übergang von der kompensatorischen Überlast-Hypertrophie in die dekompensierte Herzinsuffizienz bewirken, sind jedoch noch ungeklärt. Nach der Beobachtung von Verlusten an Myozyten im Prozess des "remodeling" wurde zunächst nur theoretisch spekuliert, daß Apoptose oder der programmierte Zelltod von Kardiomyozyten ein entscheidender Mechanismus bei diesem Übergang zum Fortschreiten des Herzversagens sein könnte (Bing, 1994).

1.2 Apoptose versus Nekrose

An dieser Stelle sollen kurz die beiden Typen des Zellunterganges, Apoptose und Nekrose, anhand ihrer wesentlichen physiologischen und biochemischen Unterschiede vorgestellt werden. Als Nekrose wird der ungeordnete oder zufällige Zelltod bezeichnet: dabei schwellen die Zellen an, die Membran reißt auf und zelluläre Bestandteile werden in den extrazellulären Raum freigesetzt und rufen eine Entzündungsreaktion hervor. Nekrose wird durch akuten unphysiologischen Streß ausgelöst, betrifft meist größere Zellverbände und verursacht eine irreversible Schädigung des gesamten Gewebes. Akute Ischämie oder ein Infarkt induzieren nach klassischer Sicht eine massive Nekrose im Myokard, die durch Bestimmung freigesetzter zellulärer Proteine im Serum diagnostiziert wird (zur Übersicht: Bartling *et al.*, 1998). Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose charakterisiert durch eine Serie regulierter, energieabhängiger molekularer und biochemischer Vorgänge, die genetisch determiniert sind. Die Zellen schrumpfen, Zellkontakte werden aufgelöst und das Chromatin kondensiert; die Membranintegrität der Zelle bleibt allerdings erhalten. Es entstehen membranumschlossene Zellreste, sogenannte apoptotische Körperchen, die von umliegenden Zellen phagozytiert werden, ohne eine Entzündungsreaktion hervorzurufen. Der apoptotische Zelltod kann einzelne Zellen im Gewebeverband betreffen und durch verschiedene Stimuli, wie zum Beispiel Strahlung, Entzug von Wachstumsfaktoren, virale Infektionen, Hypoxie oder oxidativen Streß induziert werden (zur Übersicht: Colucci, 1996; Colucci, 1997; Haunstetter und Izumo, 1998; Hetts, 1998). Der apoptotische Zelltod ermöglicht ein selektives Entfernen von Zellen zum Beispiel während der Embryonalentwicklung, Immunabwehr, Differenzierung und Homöostase von Geweben im multizellulären Organismus. Der Nachweis der Apoptose gründet sich auf ein wichtiges biochemisches Merkmal, den strukturierten Abbau der Kern-DNA (Gavrieli *et al.*, 1992; Wyllie *et al.*, 1984). Dabei wird die DNA durch Aktivierung endogener DNasen internukleosomal gespalten (Arends *et al.*, 1990). Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA apoptotischer Zellen entsteht das typische Bild der DNA-Leiter aus Fragmenten mit ca. 180 bp Größenunterschied (Wyllie *et al.*, 1984). Auf Gewebeschnitten läßt sich die apoptotische DNA-Fragmentierung im Zellkern mit der TUNEL-Methode (terminal dUTP nick end labeling) (Gavrieli *et al.*, 1992) oder durch *in situ* Ligation nachweisen (Didenko und Hornsby, 1996).

1.3 Myokardiale Apoptose

In einer Vielzahl von Experimenten und Untersuchungen konnte eindeutig bewiesen werden, daß Kardiomyozyten apoptotisch sterben können. Für ein Organ wie das Herz, das nahezu keine Fähigkeit zur Regeneration besitzt, war es daher für viele Kardiologen nur schwer akzeptierbar, daß Kardiomyozyten bei verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Zuständen diesen Weg in den programmierten Zelltod beschreiten:

- Die Eliminierung von Zellen während der Organogenese spielt, wie eingangs erwähnt, eine wesentliche Rolle im Säugerorganismus. So konnte sowohl im fetalen Herzen, als auch in der frühen Phase der postnatalen Reifung Apoptose von Kardiomyozyten und Nichtkardiomyozyten beobachtet werden (James, 1994; Kajstura *et al.*, 1995). Das Altersherz enthält deutlich weniger Kardiomyozyten als ein gesundes adultes Herz, auch hier wird Apoptose als Mechanismus für diese Zellverluste diskutiert (Kajstura *et al.*, 1996).
- 2. Ischämie und Reperfusion, wie sie im Myokard nach Verschluß und therapeutischer Wiederöffnung von Koronargefäßen auftreten können, oder ein akuter Myokardinfarkt induzieren neben einer Gewebsnekrose auch massive apoptotische Zelluntergänge von Kardiomyozyten (Gottlieb *et al.*, 1994; Kajstura *et al.*, 1996). Aus der Zusammenstellung verschiedener experimenteller Daten leitet sich die Vermutung ab, daß es sich im direkt betroffenen Areal um eine Mischform zwischen Apoptose und Nekrose handelt, die durch Hypoxie oder postischämische Reperfusion ausgelöst wird. Zum einen sind typische Merkmale der Nekrose zu

beobachten, wie zum Beispiel die Freisetzung von zellulären Proteinen, zum anderen kann dieser Myozytenverlust durch verschiedene Interventionen, die Apoptose blockieren, reduziert oder gar verhindert werden (Bartling *et al.*, 1998). Dies ist jedoch nicht Gegenstand der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit.

- 3. Ein für kardiale Apoptose-Forschung häufig verwendetes Untersuchungsmodell sind isolierte Kardiomyozyten in Kultur. Durch verschiedene Stimuli, wie Hypoxie, erhöhte Konzentrationen des Atrialen Natiuretischen Peptides (ANP) oder des Tumor Nekrose Faktors α (TNFα) ist in diesem System Apoptose induzierbar (Krown *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1997). Die beiden letzteren Experimente scheinen jedoch *in vivo* keine Bedeutung zu haben, da erhöhte Plasma-Spiegel an ANP oder TNFα lediglich zu Dysfunktionen, aber nicht zu Apoptose von Kardiomyozyten führen (Bozkurt *et al.*, 1998; Heinrich *et al.*, 1999). Zudem haben isolierte Kardiomyozyten in Kultur eine extrem hohe basale Apoptoserate (Leri *et al.*, 1998; Leri *et al.*, 1999), so daß der Bezug zur *in vivo*-Situation im Myokard fraglich ist. Enzymatisch vereinzelten oder isolierten Zellen fehlt die natürliche Umgebung sowie der ursprüngliche Kontakt zu benachbarten Zellen. Als Folge kann spontan Apoptose der Zellen auftreten, die sogenannte "Anoikis" (=Apoptose durch Vereinzelung) (Frisch und Rouslahti, 1997; Meredith und Schwartz, 1997).
- 4. Auch im nicht-ischämischen, jedoch überlasteten Myokard konnte ein erhöhtes Auftreten apoptotischer Kardiomyozytenkerne beobachtet werden, während im adulten Myokard unter Normalbedingungen nur sehr selten Apoptose nachweisbar ist. Verschiedene Tiermodelle, wie zum Beispiel Tachystimulation (supranormale Herzfrequenz durch elektrische Schrittmacher) oder intrakoronare Embolie in Hunden, spontan hypertensive Ratten (SHR) oder Aortenstenose in Ratten, zeigten eine deutliche Korrelation zwischen dem Auftreten von Apoptose und der Entstehung einer Herzinsuffizienz (Li *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1995; Sharov *et al.*, 1996; Teiger *et al.*, 1996). Beim Menschen konnte im Myokard terminal insuffizienter Herzen vermehrt Apoptose von Kardiomyozyten gefunden werden (Narula *et al.*, 1996; Olivetti *et al.*, 1997; Saraste *et al.*, 1999). Allerdings variieren die Angaben über das Ausmaß an betroffenen Kardiomyozyten zum Teil beträchtlich.

Experimentelle und klinische Daten bestätigen also die Hypothese von der Überlast-induzierten Apoptose im Myokard. Es gibt jedoch keine Aussagen darüber, wie und in welchem Ausmaß sichtbare Apoptose in einer relativ geringen Anzahl von Myozyten zum Fortschreiten der Herzinsuffizienz beiträgt. Ebenso sind Mechanismen und Stimuli, die zu Apoptose führen unklar.

Das apoptotische Programm verläuft in vielen Zellen nach einem determinierten Schema, einige dieser Mechanismen sollen im Folgenden kurz beschrieben werden.

1.4 Apoptose auslösende Rezeptoren mit intrazellulärer "Death Domain" (Todesdomäne) und ihre Liganden

Höhere Organismen haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um schnell und selektiv Zellen durch Apoptose zu entfernen (Schulze-Osthoff *et al.*, 1998). Einer dieser Mechanismen ist die Aktivierung von Zelloberflächenrezeptoren, die das apoptotische Signal in das Zellinnere leiten, durch spezifische Liganden. Rezeptoren mit Apoptose auslösender Aktivität sind strukturell verwandt und gehören zur Familie der Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Rezeptor-Familie (Smith *et al.*, 1994). Mitglieder dieser Familie erfüllen zudem eine Reihe anderer physiologischer Funktionen, wie die Induktion von Proliferation und Differenzierung. Sie sind Typ I-Membranproteine und enthalten eine Transmembrandomäne, sowie 2 - 4 extrazelluläre cysteinreiche Domänen. Apoptose auslösende Rezeptoren der Familie besitzen einen homologen intrazellulären Bereich von etwa 80 Aminosäuren, die sogenannte "Death Domain" (DD) oder Todesdomäne. Sie ist wesentlich für die Weiterleitung des apoptotischen Signals in die Zelle (Itoh und Nagata, 1993; Tartaglia *et al.*, 1993).

Die bekanntesten DD-Rezeptoren sind TNF-RI (= CD120a, p55) (Smith *et al.*, 1994; Tartaglia und Goeddel, 1992) und Fas (= CD95, APO-1) (Itoh *et al.*, 1991; Oehm *et al.*, 1992). Homologievergleiche führten zur Entdeckung weiterer "Death"-Rezeptoren (DR): DR3 (= LARD, WSL-1, APO-3, TRAMP) (Chinnaiyan *et al.*, 1996; Kitson *et al.*, 1996; Marsters *et al.*, 1996; Screaton *et al.*, 1997), DR4 (= TRAIL-R1) (MacFarlane *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 1997), DR5 (= TRAIL-R2, TRICK2) (Chaudhary *et al.*, 1997; MacFarlane *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 1997; Schneider *et al.*, 1997; Screaton *et al.*, 1997; Sheridan *et al.*, 1997; Walczak *et al.*, 1997) und DR6 (Pan *et al.*, 1998).

Mit Ausnahme von DR3, der spezifisch für lymphoide Zellen und Gewebe ist, werden die genannten DD-Rezeptoren ubiquitär exprimiert. Alle genannten DD-Rezeptoren sind in Abb. 1 zusammenfassend dargestellt. Die spezifischen Liganden für diese Rezeptoren sind ebenfalls bekannt: TNF für TNF-RI (Bazzoni und Beutler, 1996; Pennica *et al.*, 1984), Fas-Ligand (FasL) für Fas (Suda und Nagata, 1994; Suda *et al.*, 1993), Apo3-Ligand (Apo3L) für DR3 (Marsters *et al.*, 1998) und TNF-,,related" Apoptose induzierender Ligand (TRAIL = Apo2L) für DR4 und DR5 (Marsters *et al.*, 1996; Pitti *et al.*, 1996; Wiley *et al.*, 1995); der Ligand für DR6 ist noch nicht identifiziert. Diese Liganden sind Typ II-Transmembranproteine, haben einen C-terminalen Homologiebereich von etwa 150 Aminosäuren und gehören zur großen Gruppe der Zytokine, speziell zur TNF-Familie (Nagata, 1997). Sie sind fähig, oligomere Strukturen zu bilden und aktivieren den Rezeptor als Homotrimer. Lösliche Formen der Liganden entstehen durch proteolytische Abspaltung des extrazellulären Bereiches (Tanaka et al., 1995).

TNF wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen und lymphoiden Zellen produziert, FasL von aktivierten T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (Schulze-Osthoff *et al.*, 1998). Die Liganden TRAIL und Apo3L werden in vielen Geweben konstitutiv exprimiert (Marsters *et al.*, 1998; Wiley *et al.*, 1995).

1.5 Signalübertragung von Apoptose über "Death Domain"-Rezeptoren

Die Weiterleitung des apoptotischen Signals nach Rezeptoraktivierung erfolgt durch Protein-Protein-Interaktionen. Die Bindung des Liganden induziert eine Trimerisierung des Rezeptors, dessen DD daraufhin mit zytosolischen DD-enthaltenden Proteinen in Wechselwirkung treten kann (Huang et al., 1996). Ein solches DD-enthaltendes Adapterprotein ist FADD (Fasassoziiertes DD-Protein, auch Mort1) (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995). Es enthält eine C-terminale DD und N-terminal eine "death effector domain" (DED), welche wiederum an die analoge Domäne einer inaktiven Interleukin-1ß-konvertierenden Enzym-(ICE)-ähnlichen Protease bindet, die auch FLICE (FADD like ICE, = Caspase-8, MACH, Mch5) genannt wird (Alnemri et al., 1996; Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996; Srinivasula et al., 1996). Zusammen mit dem Rezeptor bilden diese Proteine einen "death inducing signaling complex" (DISC), in dem Caspase-8 eine Konformationsänderung erfährt, die zur Autokatalyse und Freisetzung aus dem Komplex führt (Medema et al., 1997). Caspasen sind Aspartat-spezifische Proteasen und zentrale Komponenten der apoptotischen Signalkaskade (Thornberry und Lazebnil, 1998). Sie liegen als Zymogene (Pro-Caspasen) in der Zelle vor und werden durch ein apoptotisches Signal aktiviert. Substrate dieser Proteasen sind unter anderem die Caspasen selbst, wodurch in einer Kaskade aus Caspasen das apoptotische Signal amplifiziert wird. Eine Reihe zytoplasmatischer und nukleärer Proteine, die zur DNA-Reparatur und -Replikation, zum RNA-Splicing und zur Aufrechterhaltung von Zytoskelettstrukturen notwendig sind, zählen ebenfalls zu Angriffspunkten von Caspasen (Thornberry und Lazebnil, 1998). Die Spaltung dieser Substrate führt letztlich zu typischen morphologischen Veränderungen apoptotisch sterbender Zellen (Nicholson und Thornberry, 1997; Villa et al., 1997).

TNF-RI und Fas können denselben apoptotischen Signalweg nutzen (Boldin *et al.*, 1996), allerdings ist ein zusätzliches Adaptermolekül namens TRADD (TNF-RI-assoziiertes DD-Protein) notwendig, um die Verbindung zu FADD herzustellen (Hsu *et al.*, 1995), während Fas direkt mit FADD interagieren kann (Boldin *et al.*, 1995; Chinnaiyan *et al.*, 1995). Außerdem kann TNF-RI, jedoch nicht Fas, auch antiapoptotische Effekte durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Liu *et al.*, 1996) induzieren. An dieser Aktivierung ist zudem ein weiteres DD-Protein namens RIP (receptor-interacting protein) beteiligt (Ting *et al.*, 1996). DR3 ist in seinem Signalweg TNF-RI sehr ähnlich und kann, wie auch DR6, NF- κ B aktivieren (Marsters *et al.*, 1996; Pan *et al.*, 1998).

Die Aktivierung von Caspasen ist ebenfalls Bestandteil der Signaltransduktion von DR4 und DR5, jedoch sind die Adaptermoleküle noch nicht genau identifiziert (Ashkenazi und Dixit, 1998). Es wird diskutiert, daß beide biochemisch unterschiedliche Wege zur Apoptoseinduktion nutzen (Walczak *et al.*, 1997). Im rechten Teil von Abb. 2 ist der Signalweg zur Auslösung von Apoptose durch DD-Rezeptoren schematisch zusammengefaßt.

Der beschriebene Weg ist wohl der bekannteste und am besten untersuchte, andere apoptotische Signalwege der DD-Rezeptoren involvieren unter anderem die Aktivierung der Caspase-2 oder die Bildung von Ceramid durch Hydrolyse von Sphingomyelin und auch die Stimulation von Streß-aktivierten Protein-Kinasen der MAP-Kinase-Familie (Ashkenazi und Dixit, 1998; Schulze-Osthoff *et al.*, 1998).

1.6 Modulation der Apoptoseauslösung über "Death Domain"-Rezeptoren durch Antagonisten

Die Auslösbarkeit der Apoptose über DD-Rezeptoren kann auf verschiedenen Ebenen des Signalweges moduliert werden. Bereits auf Rezeptorebene sind Regulationsmechanismen bekannt. Im TRAIL-System existieren sogenannte Köder- oder Decoy-Rezeptoren (DcR1, DcR2 und OPG = Osteoprotegerin) die keine funktionsfähige DD besitzen, TRAIL aber mit gleicher Affinität wie DR4 und DR5 binden, ohne jedoch das apoptotische Signal weiterzuleiten (Schneider *et al.*, 1997). Eine Überexpression von DcR1 schützt TRAIL-sensitive Zellen vor Apoptose (Pan *et al.*, 1997). Die Köderrezeptoren können demnach mit den DD-Rezeptoren um den Liganden kompetieren und vermitteln somit eine Resistenz gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose. DcR1 wird wesentlich stärker von normalen Zellen und Geweben exprimiert als von Tumorzellen (MacFarlane *et al.*, 1997).

Ein weiterer Mechanismus, der die biologische Aktivität der jeweiligen Liganden reguliert, ist das Vorhandensein von löslichen Formen der Rezeptoren (Abb. 1). Durch Rezeptor-"Shedding", d.h. proteolytische Abspaltung des extrazellulären Bereiches, entsteht die lösliche Form von TNF-RI (Ferrari *et al.*, 1995). Alternatives Spleißen des primären Transkriptes von Fas erzeugt sechs lösliche Isoformen des Rezeptors, die keine Transmembrandomäne besitzen (Cascino *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 1994; Knipping *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1995; Papoff *et al.*, 1996), von

DR3 sind elf alternative Spleißprodukte bekannt (Screaton *et al.*, 1997). Es ist zu vermuten, daß die Auslösbarkeit von Apoptose über DD-Rezeptoren von der Balance zwischen Ligand und Rezeptor abhängt, die wiederum wesentlich durch lösliche Rezeptor-Isoformen beeinflußt werden kann (Cascino *et al.*, 1995). Neben den löslichen Fas-Isoformen wurde auch ein Köderrezeptor identifiziert, der ebenfalls FasL bindet. Er wurde DcR3 genannt und blockiert FasL-induzierte Apoptose (Pitti *et al.*, 1998). DcR3 ist lediglich zu 17% homolog zu Fas und stellt damit eine zusätzliche Komponente in diesem System dar. Apoptose auslösende Rezeptoren und deren Antagonisten sind in Abb.1 zusammengefaßt.

Die Bildung eines funktionsfähigen DISC kann durch FLIP (FLICE-inhibierendes Protein) verhindert werden. FLIP, auch bekannt als I-FLICE, Usurpin, um nur einige der acht Namen zu nennen (Han *et al.*, 1997; Irmler *et al.*, 1997; Rasper *et al.*, 1998), wurde als humanes Homolog zu viralen Inhibitoren der Apoptose identifiziert. Es enthält eine DED und eine Caspase-ähnliche Domäne, die proteolytisch inaktiv ist (Irmler *et al.*, 1997). FLIP kann aufgrund dieser Homologiedomänen mit FADD und Caspase-8 interagieren und somit die Komplexierung beider Moleküle unterbinden. Weitere Mechanismen der Modulation des apoptotischen Signals, ausgelöst durch DD-Rezeptoren, bieten sich auf der Ebene der Aktivierung der Caspase-Kaskade. Es sind eine Reihe von verschiedenen Molekülen, überwiegend Homologe viraler Inhibitoren der Apoptose, identifiziert worden, die die Aktivierung von Caspasen verhindern und auch aktivierte Caspasen blockieren (Thornberry und Lazebnil, 1998; Villa *et al.*, 1997).



Abb. 1: Zusammenstellung der "death domain"-Rezeptoren und ihrer Antagonisten. Als gemeinsames Strukturmerkmal sind die cysteinreichen Domänen (Kreise) und die DD (schwarzes Rechteck) hervorgehoben. Antiapoptotische Moleküle sind rot dargestellt. DR: "death"-Rezeptor; DcR: "decoy"-Rezeptor; OPG: Osteoprotegerin.

1.7 Mitochondriale Auslösung von Apoptose

Neben dem beschriebenen Weg der Auslösung von Apoptose durch die Aktivierung von DD-Rezeptoren spielen auch eine Reihe anderer Stimuli und Signale eine wesentliche Rolle, die ebenfalls zur Aktivierung einer Caspase-Kaskade führen.

Eine Schlüsselstellung bei der Regulation der Apoptose nehmen die Mitochondrien ein (Green und Reed, 1998). Die Unterbrechung des mitochondrialen Transmembranpotentials, die sogenannte "permeability transition" (PT), mit Öffnung von Megaporen, wird als frühes Merkmal der Apoptose diskutiert (Marchetti *et al.*, 1996). Während dieses Prozesses werden proapoptotische Proteine aus den Mitochondrien freigesetzt, wie zum Beispiel die Caspasen-2 und -9 (Susin *et al.*, 1999), AIF (Apoptose induzierender Faktor) (Susin *et al.*, 1996) und Apaf-2 (Apoptose-Protease aktivierender Faktor), später identifiziert als Cytochrom c, ein längst bekannter diffusibler Elektronencarrier der Atmungskette (Earnshaw, 1999; Hengartner, 1998; Kluck *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1996). Cytochrom c bildet mit Apaf-1, ATP und Pro-Caspase-9 (Apaf-3) einen Komplex, der Apoptosom genannt wird (Abb. 2) und aus dem aktivierte Caspase-9 als Initiator einer Caspase-Kaskade hervorgeht (Li *et al.*, 1997; Vaux, 1997). Nach Freisetzung von AIF aus dem mitochondrialen Intermembranraum erfolgt seine Translokation in den Nukleus, die zur Kondensation des Chromatins und zum DNA-Abbau führt (Susin *et al.*, 1999).

Wichtige Regulatoren der Apoptose sind Proteine der Bcl-2-Familie. Es werden pro- und antiapoptotische Mitglieder unterschieden. Sie sind hauptsächlich in der äußeren Mitochondrienmembran, aber auch in der Kernmembran und im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und enthalten als gemeinsames Strukturmerkmal unterschiedliche Kombinationen konservierter BH-Domänen (<u>Bcl-2 Homologie</u>, BH 1 bis 4) (Adams und Cory, 1998; Kroemer, 1997). Diese Domänen ermöglichen die Bildung von Homo- und Heterodimeren, durch die sich die einzelnen Mitglieder gegenseitig in ihrer Funktion beeinflussen können. Eine Vielzahl mitochondrialer Vorgänge werden von Bcl-2-Proteinen moduliert (Green und Reed, 1998). Bcl-2 und Bcl-x_L (beide antiapoptotisch) blockieren die Freisetzung proapoptotischer Faktoren (AIF und Cytochrom c) und regulieren die Öffnung der PT-Pore (Abb. 2) (Kroemer, 1997; Reed, 1997; Vaux, 1997). Die Aktivität von Bcl-Proteinen kann auch durch Phosphorylierungen oder Spaltung durch Caspasen (Funktionsumkehr) beeinflußt werden (Clem *et al.*, 1998; Franke und L.C., 1997).

In direktem Zusammenhang mit Apoptose steht auch das Tumorsuppressorgen p53, das durch Hypoxie oder DNA-Schädigungen induziert wird und einen stabilen Zellzyklus-Arrest oder Apoptose vermittelt (Polyak *et al.*, 1997). Als Transkriptionsfaktor aktiviert p53 eine Reihe von

Genen, deren Produkte letztlich zur oxidativen Schädigung der Mitochondrien und zur Apoptose führen. Des weiteren werden durch p53 das proapoptotische Bax und der DD-Rezeptor Fas induziert (Bennet *et al.*, 1998; Miyashita und Reed, 1995).

In Abb. 2 werden die vorgestellten Mechanismen, die sich auch gegenseitig in ihrer Funktion beeinflussen, nochmals zusammengefaßt.

Die hier vorgestellten Grundzüge der Regulation des programmierten Zelltodes variieren im Detail erheblich zwischen verschiedenen Zellen und Organen. Im Herzen mit insuffizienzbedingter Überlast gibt es kaum Kenntnisse über die Signalwege der Apoptoseauslösung. Dies wäre jedoch nützlich, wenn bestehende Therapien der Herzinsuffizienz optimiert oder neue Therapieansätze entwickelt werden sollen.



Abb. 2: Zusammenfassung wichtiger Mechanismen, die an der Auslösung von Apoptose beteiligt sind. Die aktivierte Kaskade von Caspasen ist zentrales Element der Apoptose und führt zu terminalen Veränderungen der sterbenden Zelle. Die Formation eines mitochondrialen Apoptosoms oder eines DISC (death inducing signaling complex) an der zytosolischen DD von aktivierten Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Familie führt zur Autoaktivierung von Initiator-Caspasen. Eine Aktivierung von p53 führt ebenfalls zur Auslösung von Apoptose. Apaf: Apoptose-Protease aktivierender Faktor, CC: Cytochrom c; PT: permeability transition; ROS: reaktive Sauerstoff-Spezies.

1.8 Aufgabenstellung

Der apoptotische Verlust von Kardiomyozyten durch Überdehnung des Myokards ist ein attraktives, aber noch spekulatives Konzept für den ungeklärten Übergang von kompensatorischer Überlast-Hypertrophie zur Dekompensation in der terminalen Herzinsuffizienz (vgl. 1.1). Die vorstehend geschilderten Daten zur Histologie apoptotischer Kardiomyozytenkerne im versagenden Myokard können nicht beantworten, ob es sich dabei um ein quantitativ vernachlässigbares Epiphänomen handelt oder tatsächlich um einen kritischen Mechanismus des Übergangs in die Dekompensation. Deshalb bestand die Aufgabe der vorliegenden Dissertation zur Problematik der Apoptose bei Herzinsuffizienz in folgender Vorgehensweise:

In einem beschreibenden Teilansatz sollte untersucht werden, ob es Elemente der apoptotischen Signaltransduktion gibt, die durch Überlast *in vivo* verändert und durch Korrektur der Überlast wieder renormalisiert werden können. Dieser Teilansatz sollte sich auf die Signaltransduktion der "Death-Domain"-Rezeptoren und ihrer Liganden konzentrieren und dort Veränderungen identifizieren, die spezifisch durch kardiale Überlast *in vivo* induziert werden. Mitochondriale Signal-wege der Apoptoseauslösung sollten von anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe analysiert werden.

In einem zweiten Ansatz sollte ein Modell entwickelt werden, mit dem *in vitro* Dehnungsinduzierte Apoptose in einem physiologisch relevanten Bereich ausgelöst werden kann, so daß später dieses Modell benutzt werden kann, um die Relevanz dieser dehnungsinduzierten Apoptose für die Kardiomyozytenfunktion durch geeignete Eingriffe in die Apoptoseauslösung mittels Transfektion zu beweisen. Es gibt bereits Literatur zur Signaltransduktion der Apoptose durch Dehnung und andere Stimuli in isolierten Kardiomyozyten (Leri *et al.*, 1998; Leri *et al.*, 1999). Für die Fragestellung nach der pathophysiologischen Relevanz der dehnungsinduzierten Apoptose sind diese Daten nichtssagend, da isolierte Kardiomyozyten eine extrem hohe artifizielle Apoptoserate haben (vgl. 1.3).

Es gäbe auch die Möglichkeit, transgene Mäuse mit suppressiven Eingriffen in die Myokardapoptose zu generieren (Li *et al.*, 1997). Solche Eingriffe führen zu massiven Veränderungen der Herzen, da Apoptose von Kardiomyozyten ein integraler Bestandteil der embryonalen Organogenese der Herzens ist (James, 1994). Dieser Ansatz ist daher ebenfalls nicht geeignet, um die Relevanz der Apoptose für die Überlast "normaler" Herzen zu klären.

Mit dem System der Kultivierung intakter Muskelstreifen (Trabekel) *in vitro* bietet sich dahingehend eine Alternative an. Dieses Modell sollte daher auf die Eignung zur Untersuchung der dehnungsabhängigen Apoptose hin überprüft werden.

2 MATERIAL

2.1 Humanes Herzgewebe

Für die Untersuchungen stand humanes Myokard zur Verfügung:

- Beim Anschluß von Patienten an die Herz-Lungen-Maschine während eines herzchirurgischen Eingriffs fällt routinemäßig ein Stück des rechten Atriums (rechtes Herzohr, RA) an.
- Linksventrikuläres Myokard (LV) wurde von explantierten Herzen mit terminaler Herzinsuffiz nach Transplantation entnommen.
- Als Kontrollen stand Gewebe des linken Ventrikels (LV) von Spenderherzen zur Verfügung, die aus technischen Gründen nicht transplantiert wurden.
- Während des Einbaus eines ventrikulären Unterstützungssystems (ventricular assist device = VAD) in Patienten zur Überbrückung der Zeit bis zur Transplantation, fiel routinemäßig ein Stück des LV an (prä-VAD). Ein weiteres Stück vom LV desselben Patienten wurde nach der Transplantation des Herzens entnommen (post-VAD).

Diese Stücke wurden unverzüglich nach Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert.

Der überwiegende Teil der Proben stammte aus der Klinik für Herz- und Thorax-Chirurgie des Klinikums Kröllwitz der MLU unter der Leitung von Prof. Dr. H.-R. Zerkowski. Weitere linksventrikuläre Myokardproben wurden uns in Zusammenarbeit mit dem Pharmakologischen Institut des Universitätskrankenhauses Eppendorf, Hamburg von Prof. Dr. T. Eschenhagen zur Verfügung gestellt.

Linksventrikuläre Myokardproben von Patienten, die mit einem VAD behandelt wurden, erhielten wir von der Klinik für Thorax- und Kardiovaskuläre Chirurgie Bad Oyenhausen unter der Leitung von Prof. Dr. R. Körfer.

Die Patienten wurden vor dem Eingriff über die Verwendung des anfallenden Materials informiert und gaben ihre Einwilligung zu wissenschaftlichen Untersuchungen. Die Verwendung humanen Materials wurde von der Ethikkommission der Universität genehmigt.

2.2 Tierisches Myokardgewebe und neonatale Rattenkardiomyozyten

Für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse-, Ratten- bzw. Kaninchenherzen von gesunden Tieren verwendet, deren Organe unterschiedlichen Experimenten dienten, bei denen das Herz nicht benötigt wurde. Diese Materialien wurden in Kooperation mit verschiedenen Instituten der Medizinischen Fakultät der MLU zusammengetragen. Neonatale Rattenkardiomyozyten in Kultur wurden uns freundlicherweise von der Kardiologischen Intensivmedizin (Forschungslabor) von Frau Dr. U. Müller-Werdan zur Verfügung gestellt.

Ein gesundes Schweineherz wurde direkt aus dem Schlachthof Weißenfels bezogen.

2.3 Kultivierung von rechtsventrikulären Trabekeln aus Kaninchenherzen

Die Präparation von rechtsventrikulären Trabekeln von Kaninchen und deren Kultivierung, sowie die Messung physiologischer Parameter wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Kardiologie und Pneumologie der Universität Göttingen von Dr. P. Janssen unter Leitung von Prof. Dr. G. Hasenfuß durchgeführt.

Vor Entnahme des Herzens wurden die weiblichen Kaninchen (ca. 4 Monate alte New Zeeland White Star mit 1,5-2,5 kg Körpergewicht) heparinisiert und mit Thiopental (50 mg/kg) anästhesiert. Die isolierten Kaninchenherzen wurden nach Entnahme kurz mit modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung (enthält 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 1,2 mM NaHCO₃, 10 mM Glucose, 0,25 mM CaCl₂) gespült und im Anschluß rechtsventrikuläre Trabekel mit einer Länge von durchschnittlich 2,9 mm, einer Breite von 465 μ m und einer Dicke von 370 μ m vorsichtig präpariert. Diese Trabekel wurden in der Muskelkammer (Abb. 3) unter sterilen Bedingungen fixiert. Die Befestigung an einer Mikroschraube ermöglicht eine Längenjustierung des Trabekels. Auf diese Weise lassen sich zudem verschiedene Dehnungszustände erzeugen. Die Inkubation der Präparate erfolgte in einem modifizierten Zellkulturmedium (enthält 1,75 mM Ca²⁺) unter einer kontinuierlichen 95% O₂ / 5% CO₂-Atmosphäre bei 37 °C bis zu 48 h (Janssen *et al.*, 1998). Die Trabekel wurden unter 3 verschiedenen Bedingungen (Dehnungszuständen) kultiviert:

- 1. *ohne jegliche Last:* dabei ist der Trabekel so in der Muskelkammer eingespannt, daß eine isotonische Kontraktion ohne meßbare Spannungsentwicklung möglich ist;
- *leicht gedehnt* bis zu einer meßbaren systolischen Spannungsentwicklung (Nachlast), jedoch ohne Erreichen einer meßbaren diastolischen Vorspannung (Vorlast);
- 3. *gedehnt auf L_{max}*: die isometrische Kontraktion erreicht bei dieser Vordehnung die höchstmögliche Spannungsentwicklung, die Sarkomerlänge beträgt dabei vor der Kontraktion etwa 2,0 - 2,2 μ m (Janssen und Hunter, 1995). Meßbare Spannungen vor und während der Kontraktion ermöglichen die Erfassung von Vor- und Nachlast. Der Herzmuskel arbeitet im Gegensatz zum Skelettmuskel im gesunden Herzen normalerweise unterhalb von L_{max} (Silbernagel und Despopoulos, 1991).

Oxidativer Streß wurde in diesem System nach der H_2O_2 -Fe³⁺-Methode zur Generierung von Hydroxyl-Radikalen erzeugt (Janssen *et al.*, 1999). Die Trabekel wurden diesen Radikalen für eine Dauer von 2 min ausgesetzt.

Nach Entnahme der Trabekel aus der Muskelkammer wurden die Präparate in Blöcke und Muskel unterteilt: als Blöcke wurden die Bereiche des Trabekels bezeichnet, die zur Fixierung in der Kammer zwischen Kraftaufnehmer und Mikroschraube (vgl. Abb. 3 B) dienten und dadurch eine Beschädigung aufwiesen, der Teil zwischen den Blöcken wurde als Muskel bezeichnet. Die Unterteilung in beide Bereiche erfolgte nach mikroskopischer Begutachtung. Kontrolltrabekel wurden nicht in die Muskelkammer eingespannt, sondern sofort nach Präparation in flüssigem Stickstoff eingefroren, eine Unterteilung in Blöcke und Muskel erfolgte hier nicht.



Abb. 3: Schematische Darstellung der Muskelkammer zur Kultivierung rechtsventikulärer Kaninchentrabekel. (A) Darstellung der gesamten Apparatur. Die Trabekel wurden zwischen eine korbähnliche Erweiterung eines Kraftaufnehmers (KA; Dokumentation muskelphysiologischer Parameter) und eine hakenähnliche Erweiterung einer Mikroschraube (MS; Justierung der Muskellänge) im Kulturbad befestigt. Alle Flüssigkeiten wurden mit 95% $O_2 / 5\%$ CO₂ begast. Der Einbau einer Pumpe verhinderte peristaltische Druckänderungen. (B) Details der Muskelkammer. Nach Positionierung des Trabekels wurde die Kammer mit Silikon (O-Ring) verschlossen.

E. coli-Stamm	Genotyp	Referenz
XL 1-Blue MRF' Kan	(mcrA)183(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 end A1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB, lacI ^q Z Δ M15 Tn5 (Kan ^R)]	Stratagene-Katalog, Heidelberg
INVαF' One Shot [™]	endA1 recA1 hsdR17(r^{-k} ,m ^{+k}) spE44 λ - thi-1 grA relA1 ϕ 80 lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) deoR ⁺ F'	Invitrogen-Katalog, Groningen, NL

2.4 Bakterienstämme

2.5 Vektoren

Plasmid	wesentliche Merkmale	Referenz
pCR-Script TM SK(+)	Amp ^R , MCS im lacZ-Gen	Stratagene-Katalog
pCR [®] II-TOPO	Amp ^R , Kan ^R , MCS im lacZ-Gen	Invitrogen-Katalog

2.6 Geräte und Chemikalien

Folgende Geräte wurden zusätzlich zu den unter 2. genannten verwendet:

Mini, Midi und Maxi Gel-System	MWG-Biotech GmbH, Ebersberg
PowerPac 3000 Supply und 200/2.0	BioRad, München
Power Supply PS 250 und PPS 200-10	MWG-Biotech GmbH, Ebersberg
Bakterienschüttler Certomat U/H	Braun, Melsungen
Spektralphotometer Biochrom 4060	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
UV-Transilluminator	Schütt, Göttingen
Brutschrank	Memmert GmbH + CoKG, Schwabach
Mikroskop IMT-2	Olympus, Hamburg
Refrigerated Superspeed Zentrifuge RC-5B	Sorvall, Newtown USA
Eppendorf Tisch- und Tischkühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg

Die verwe	ndeten Chemikalien, Enzyme und Fein	nchemikalien wurden von folgenden Firmen
bezogen:	Roche Diagnostics, Mannheim	InViTek GmbH, Berlin
	Gibco BRL, Eggenstein	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
	Merck KgaA, Darmstadt	Peqlab, Erlangen
	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe	Sigma, Deisendorf

Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von Gibco BRL synthetisiert.

3 METHODEN

3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

3.1.1 Präparation von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Myokard (LV, RA) wurde mittels CsCl-Ultrazentrifugation (Chirgwin et al., 1979) durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen wurden mit DEPC (0,01%) behandelt bzw. steril angesetzt, Glasgeräte und Spatel üN bei 200 °C gebacken. Die Myokardproben wurden nach Entnahme unverzüglich in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung darin gelagert. Das Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff zermörsert, in GTC-Lösung (1 ml GTC-Lösung pro 100 mg Gewebe) überführt und mit Hilfe eines Ultraturrax (IKA-Werke, Staufen) homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend bei 3.000 Upm, 10 min, RT zentrifugiert und der Ü vorsichtig auf ein CsCl-Kissen (2,6 ml), welches im Zentrifugen-Röhrchen (12 ml Tube PA, Sorvall, Newtown, USA) vorgelegt wurde, geschichtet. Die Ultrazentrifugation erfolgte bei 33.000 Upm und 21 °C für 22 h (Rotor: TH 641, Sorvall). Nach der Zentrifugation befand sich das RNA-Pellet unter dem CsCl-Kissen, der Ü wurde vorsichtig abgenommen und der Boden des Zentrifugenröhrchens (enthält das RNA-Pellet) abgetrennt, das RNA-Pellet in 300 µl TSPE-Puffer gelöst und in ein Greiner-Röhrchen überführt. Die RNA wurde mit 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat, pH 6,0 und 10 ml 96% Ethanol bei -20 °C, üN präzipitiert; am folgenden Tag bei 10.000 Upm, 30 min, 4 °C abzentrifugiert, 2x mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem geeigneten Volumen DEPC-H₂O aufgenommen und bei -80 °C gelagert. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte wie unter 3.2.1 beschrieben, ein Aliquot der RNA wurde zur Kontrolle in einem 1%igen Agarosegel (Abb. 4) aufgetrennt (vgl. 3.2.2).

GTC-Lösung, pH 7,0: 4 M	GTC	CsCl-Kissen: 5,7 M	CsCl
1%	N-Lauroylsarcosine	100 mM	Na-EDTA, pH 6,5
25 mM	Na-Acetat	6 mM	β-Mercaptoethanol
1 mM	Na-EDTA		
1 M	ß-Mercaptoethanol		
<i>TSPE-Puffer</i> : 10 mM	Tris/HCl, pH 7,0		
1%	N-Lauroylsarcosine		
5%	Phenol		
1 mM	Na-EDTA		



Abb. 4: RNA einer Ventrikelpräparation nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Die hochreine RNA ist frei von DNA-Kontaminationen und Abbauprozessen. Die Banden für die 28- und 18S rRNA sind deutlich erkennbar.

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Kaninchentrabekeln erfolgte entsprechend dem Standard-Protokoll des RNeasy Mini Kit (Quiagen, Hilden). Das Gewebe wurde hierbei ebenfalls mit Hilfe eines Ultraturrax in 600 µl des entsprechenden Lyse-Puffers aufgeschlossen. Zusätzlich wurden zur Entfernung genomischer DNA die Proben in den Zentrifugiersäulchen mit RNase freier DNase I (Quiagen) für 15 min bei 30 °C inkubiert. Nach zwei Waschschritten wurde die RNA in einem Volumen von 30 µl eluiert und wie o.g. vermessen und gelagert.

3.1.2 Isolierung genomischer DNA

Zur Präparation genomischer DNA aus Myokard wurde ein DNA-Isolierungskit (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) verwendet.

5 bis 50 µg Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff zermörsert und in 600 µl Aufschluß-Puffer aufgenommen. Adhärente Zellen (2,5 x 10⁶) wurden nach Absaugen des Mediums 2x mit 37 °C warmem PBS (1 Tablette auf 500 ml H₂O, Gibco BRL, Eggenstein) gespült, abgeschabt, in 600 µl Lyse-Puffer suspendiert, durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren aufgeschlossen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Homogenat wurde mit 5 µl Proteinase K (20 mg/ml, Roche Diagnostics, Mannheim) versetzt und für 3 h (Gewebe üN) bei 60 °C inkubiert. Nach einer RNaseA-Behandlung von 20 min bei 37 °C wurden 200 µl Proteinpräzipitationslösung zugegeben, 15 s gevortext und 3 min bei 14.000 Upm, RT, zentrifugiert. Der Ü wurde in ein Reaktionsgefäß mit 600 µl Isopropanol überführt und die DNA 30 min bei 14.000 Upm, 4 °C abzentrifugiert, 2x mit 70% Ethanol gewaschen und 15 min bei RT getrocknet. Die DNA wurde üN bei RT in 50-100 µl DNA-Hydratations-Lösung gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte wie unter 3.2.1 beschrieben. Alle Lösungen und RNaseA waren im Kit enthalten.

3.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA

3.1.3.1 Kultivierung von Bakterien

Die benutzten *E. coli*-Stämme wurden bei 37 °C üN auf LB-Agarplatten oder in LB-Flüssigmedium (beides von Gibco BRL, Eggenstein) bei 200 Upm und unter Zusatz von Antibiotika (Ampicillin: 100 µg/ml; Kanamycin: 50 µg/ml) bebrütet.

3.1.3.2 Plasmid-Mini-Präparation

Zur schnellen Überprüfung von Klonierungen wurden Plasmide mit Hilfe des Quantum Prep[®] Plasmid Miniprep Kits (BioRad, München) aus 2 ml einer Bakterienkultur entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert. Diese hochreine Plasmid-DNA konnte für Restriktionsanalysen und Sequenzierungsreaktionen verwendet werden.

3.1.3.3 Plasmid-Midi-Präparation

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurde der Plasmid Midi Kit (Quiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers benutzt. Es wurden 25 ml einer Bakterienkultur eingesetzt.

3.2 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.2.1 Konzentrationsbestimmung

Um Qualität und Quantität der RNA- und DNA-Proben zu bestimmen, wurden diese geeignet verdünnt und die Extinktion bei 260 und 280 nm im Spektralphotometer gemessen. Die Konzentration errechnet sich aus folgender Beziehung: 1 A_{260} -Einheit = 50 µg DNA/ml 1 A_{260} -Einheit = 40 µg RNA/ml.

3.2.2 Agarosegelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA oder RNA wurden 1-1,5% ige Agarosegele mit 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid hergestellt. Die Agarose wurde in der Mikrowelle aufgekocht und nach Abkühlen in die Gelkammer gegossen. Als Gel- und Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer. Die Probe wurde vor dem Auftragen mit 1/10 Vol. Probenpuffer gemischt. Die Auftrennung erfolgte mit maximal 8 V/cm Laufstrecke (Sambrook *et al.*, 1989).

Zum Nachweis apoptotischer DNA-Leitern wurde der sensitivere DNA-Farbstoff SYBR™ Green (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) anstelle von Ethidiumbromid dem Gel zugesetzt (10 µl/150 ml). Zur Dokumentation wurden die Gele fotografiert (Polaroid Film 665, Polaroid GmbH, Offenbach).

Die Länge linearer DNA-Fragmente konnte durch direkten Vergleich mit einem definierten Größenstandard (100 bp-Leiter, 1 kb-Leiter), der beim Gellauf mitgeführt wurde, bestimmt werden.

1x TBE-Puffer:	89 mM	Tris	10x Probenpuffer: 50%	Glycerol
	89 mM	Borsäure	0,25%	Bromphenolblau
	2,5 mM	Na-EDTA		in TE-Puffer
TE-Puffer:	10 mM	Tris/HCl pH 7,5		
	1 mM	Na-EDTA		

3.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente oder PCR-Produkte wurden nach elektrophoretischer Auftrennung unter Verwendung des Quiaex II Agarose Gel Extraktions Kit (Quiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aus dem Gel isoliert.

3.2.4 Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren

Zur Aufreinigung von DNA- oder RNA-Lösungen wurde ein Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) im Verhältnis 1:1 zugegeben, gemischt und 5 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Die Oberphase wurde abgenommen und der Vorgang mit Chloroform /Isoamylalkohol (24:1) wiederholt. Die DNA bzw. RNA wurde aus der wäßrigen Oberphase nach Zugabe von 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat oder 10 M NH₄-Acetat und 2,5 Vol. 96% Ethanol oder 0,7 Vol. Isopropanol gefällt und anschließend 30 min bei 14.000 Upm, 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde 2x mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer oder H₂O aufgenommen.

3.2.5 Restriktionsansätze

Zur Spaltung von DNA wurden kommerziell erhältliche Restriktionsenzyme mit den entsprechenden Reaktionspuffern verwendet. Die Reaktion wurde mit 2 U Restriktionsenzym pro µg DNA über 2 h bei 37 °C durchgeführt. Die Überprüfung der Reaktion erfolgte durch Agarosegelelektrophorese.

3.2.6 Reverse Transkriptions-Polymerasekettenrektion (RT-PCR)

Das Vorhandensein bestimmter mRNA-Transkripte in der Gesamt-RNA einer Probe wurde durch reverse Transkription (RT) der RNA in cDNA und nachfolgende Amplifikation durch PCR mit einem spezifischen Primerpaar nachgewiesen. Die Methode eignet sich auch zur Quantifizierung von mRNA-Expressionen (Köhler *et al.*, 1995). Die Reaktionen erfolgten in 500 µl Gefäßen (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) in einem Thermocycler (TRIO-Thermoblock, Biometra, Göttingen).

RT-Ansatz (25 µl-Ansatz):

250 - 2.000 ng Gesamt-RNA wurden für 3 min bei 72 °C denaturiert, auf 4 °C abgekühlt und auf Eis folgender Reaktionsmix dazupipettiert:

DEPC-H ₂ O	ad 25 µl	x μl
First Strand-Puffer	5x	5 µl
dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech)	12,5 mM	1 µl
DTT	10 mM	2,5 µl
RNaseOUT™ (Gibco BRL)	40 U/µl	0,5 µl
random Primer (Gibco BRL)	100 ng/µl	3 µl
SuperScript [™] II (Gibco BRL)	200 U/µl	0,2-1 µl

Der Ansatz wurde für 30 min bei 42 °C inkubiert, anschließend für 2 min bei 95 °C denaturiert und bei −20 °C gelagert. Zur Überprüfung der eingesetzten RNA auf DNA-Kontamination wurde eine Kontrolle ohne SuperScriptTM II mitgeführt. Für die nachfolgende PCR diente der erhaltene RT-Ansatz als Template.

PCR-Ansatz (50 µl-Ansatz):

RT-Ansatz		2-10 µl
PCR-Puffer (mit MgCl ₂)	10x	5 µl
dNTPs	100 μΜ	6 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (Amersham Pharmacia Biotech)	5 U/µl	0,4 µl
sense Primer	10 pmol/µl	1 µl
antisense Primer	10 pmol/µl	1 µl
H ₂ O	ad 50 µl	x μl

Der Ansatz wurde auf Eis pipettiert und mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet.

Schritt 1:	120 s	95 °C	Denaturierung
Schritt 2:	30 s	94 °C	Denaturierung
Schritt 3:	30 s	$T_m {}^\circ C$	Primer-Annealing
Schritt 4:	30 s	72 °C	DNA-Synthese (die Schritte 2-4 wurden jeweils wiederholt)
Schritt 5:	180 s	72 °C	abschließende DNA-Synthese
Schritt 6:	~	4 °C	

Die PCR-Amplifikation wurde generell mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

Die Annealingtemperatur in Schritt 3 ist abhängig von der Schmelztemperatur (T_m) der eingesetzten Primer und wurde für jedes Primerpaar bestimmt (vgl. Tab. 1). Die Wiederholung der Schritte 2 - 4 (Zyklenzahl) ist wiederum abhängig von der Menge des eingesetzten Templates und wurde für Quantifizierungsexperimente ebenfalls für jedes spezifische Produkt optimiert, um nicht die Plateauphase der PCR-Amplifizierung, bei der die Menge an PCR-Produkt ab einer bestimmten Zyklenzahl konstant bleibt, zu erreichen (Köhler *et al.*, 1995).

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden wie unter 3.2.2 angegeben gelelektrophoretisch aufgetrennt und dokumentiert.

3.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Anstelle eines RT-Ansatzes wurden entweder 20-100 ng genomische DNA oder Plasmid-DNA (Überprüfung rekombinanter Klone) als Template dem unter 3.2.6 angegebenen PCR-Ansatz zugesetzt.

3.2.8 Sequenzierung

Zur Sequenzierung von DNA wurde der Taq DyeDeoxy[™] Terminator Cycle Sequenzierungs-Kit (Perkin Elmer, Weiterstadt) verwendet, dem eine Kombination der Sequenzierung nach Sanger *et al.* (1977) und der PCR zugrunde liegt.

Der Sequenzierungsansatz enthielt 5 μ l Reaktionsmix (Kit), 5 pmol des spezifischen Primers, 500 ng Plasmid-DNA oder 100 ng gereinigtes PCR-Fragment in einem Reaktionsvolumen von 20 μ l. Folgendes Temperaturprofil wurde 29x wiederholt: 50 s 96 °C (Denaturierung); 20 s 55 °C (Primer-Annealing), 4 min 60 °C (DNA-Synthese). Die DNA wurde wie unter 2.2.4 beschrieben mit NH₄-Acetat und Ethanol gefällt, gewaschen und in 4 μ l Probenpuffer (Kit) gelöst und im ABI Prism 373 DNA-Sequencer (Perkin Elmer) analysiert.

Methoden

Gen	Primer	Position	Tm [°C]	Fragmentgröße	Sequenz	5'	\rightarrow	3'			Accession-Nr.
GAP-DH	S	220-240	60	442	CAT CAC	CAT	CTT	CCA	GGA	GCG	J02642
	AS	643-661			TGA CCT	TGC	CCA	CAG	CCT	TG	
hum FADD	S	456-475	66	296	GAA AGA	TTG	GAG	AAG	GCT	GG	HSU24231
	AS	733-751			ACG ATT	CGG	AGG	TAG	ATG	С	
hum Fas	S1	195-211	56	819	ATG CTG	GGC	ATC	TGG	ACC		M67454
	S2	556-574	56	458	GGA CCC	AGA	ATA	CCA	AGT	G	
	AS	1013-995			CTG TTC	TGC	TGT	GTC	TTG	G	
hum FasL	S	350-372	64	344	GGA TTG	GGC	CTG	GGG	ATG	TTT CA	HSU11821
	AS	693-670			TTG TGG	CTC	AGG	GGC	AGG	TTG TTG	
hum FLICE	S	56-75	62	458	TGG CCT	CCC	TCA	AGT	TCC	TG	U58143
	AS	494-514			GCA GGC	TCT	TGT	TGA	TTT	GGG	
hum Flip L	S	639-658	64	569	ACC CTC	ACC	TTC	TTT	CGG	AC	U97074
	AS	1207-1189			GCC CAG	GGA	AGT	GAA	GGT	G	
hum Flip S	S	550-569	64	377	ACC CTC	ACC	TTC	TTT	CGG	AC	U97075
	AS	907-926			AGG ACA	ATG	GGC	ATA	GGG	TG	
hum TNF RI	S	29-49	62	304	TTG TGC	CTA	CCC	CAG	ATT	GAG	M755866
	AS	312-332			CTG GAG	GTG	AAG	GTG	GAA	CTG	
hum TRADD	S	727-745	60	352	GGT CTC	AAA	TGG	CGC	AAG	G	L41690
	AS	963-946			GGT CAG	GCC	CAG	CAA	GTC		
hum bcl-x _L	S	158-179	64	551	GGT GGT	TGA	CTT	TCT	CTC	CTA C	Z23115
	AS	708-690			CAA AAG	TAT	CCC	AGC	CGC	C	
mouse Fas	S	50-70	64	694	ATG CTG	TGG	ATC	TGG	GCT	GTC	M83649
	AS	721-743			TGT CTT	CAG	CAA	TTC	TCG	GGA TG	
rat Fas	S	56-76	64	774	ATG CTG	TGG	ATC	ATG	GCT	GTC	D26112
	AS	811-829			ATC TTG	GGG	GCT	GTT	GTG	C	
swine Fas	S	174-190	56	741	CTG TCA	GCC	ATG	CCC	TC		AJ001202
	AS	895-914			GCA AGA	GCA	GAA	AGT	TTG	GC	
rabbit ANP	S	4-22	60	555	ACA GTG	ACG	GAC	AAA	GAC	CC	M12046
	AS	557-538			CTT CCC	TGG	CTG	TTA	TCT	TC	
rabbit Fas	S		56	350	GAA CAC	TGT	GAT	CCT	TGT	ACC	-
	AS				GTG GCT	TCA	TTT	ACA	CCA	TTC	

Tab. 1: Auflistung der für die PCR-Amplifikation verwendeten Primerpaare. Die GAP-DH-Primer sind für verschiedene Spezies spezifisch und ergeben jeweils ein Fragment gleicher Größe. S = sense-; AS = antisense-Orientierung. Rabbit Fas war noch nicht in der Genbank verfügbar.

3.3 Kompetitive Standard kalibrierte RT-PCR

Für die mRNA-Expressionsuntersuchungen von Fas, DR4, DR5, DcR1 und TRAIL in humanen Myokardproben wurde eine Standard kalibrierte kompetitive RT-PCR etabliert, die ausführlich in Abb. 5 erklärt wird. Diese Methode ist sehr aufwendig, bietet aber den Vorteil, niedrig exprimierte Gene untersuchen zu können und auch geringe Expressionsunterschiede zu analysieren, da die Anzahl von Molekülen einer bestimmten mRNA-Spezies aus Gesamt-RNA bestimmt wird (Köhler *et al.*, 1995).



Abb. 5: Zusammenfassung der Teilschritte der Standard kalibrierten, kompetitiven RT-PCR. Für die Quantifizierung spezifischer mRNA-Moleküle einer Probe sind 4 oder 5 RT-Ansätze notwendig. Diese enthalten jeweils dieselbe Menge an Gesamt-RNA der Probe, aber eine unterschiedliche Zahl an Molekülen eines cRNA-Standards (vgl. 3.3.1) in definierten Verdünnungsstufen. Nach der RT werden die Ansätze in eine PCR mit spezifischen Primern eingesetzt. Während dieser Reaktion kompetieren Target-cDNA und die Standard-cDNA um die Reaktionskomponenten (die Bande der Target-DNA wird schwächer in den Ansätzen mit zunehmender Anzahl eingesetzter Standard-Moleküle). Anschließend werden die Reaktionsprodukte gelelektrophoretisch aufgetrennt, fotografiert und densitometrisch ausgewertet. Anhand der bekannten Menge eingesetzter Standard-RNA-Moleküle kann die Zahl der mRNA-Moleküle in der Probe ermittelt werden (vgl. 3.3.4).

3.3.1 Herstellung eines RNA-Standards

Herstellung eines Deletionsfragmentes

Die verkürzten RNA-Standards (für Fas, DR4, DR5, DcR1 und TRAIL) für die kompetitive RT-PCR wurden in mehreren PCR-Schritten nach einer Methode von Förster (1994) hergestellt und sind in Abb. 6 ausführlich dargestellt.

Im 1. Schritt wurde nach RT der RNA (vgl. 3.2.6) mit spezifischen Primern ein Target-DNA-Fragment von ca. 450-600 bp (spezifisch für die jeweilige Sequenz) amplifiziert und nach Agarosegelelektrophorese aus dem Gel isoliert (vgl. 3.2.2,3.2.3). Dieses Fragment diente in einem 2. PCR-Schritt als Template für einen der beiden Primer und einem eine Deletion überspannenden Linker-Primer, bestehend aus 19 bis 20 b der Deletion nachfolgenden Sequenz und 10 b des 3'-Endes des zugehörigen sense- oder antisense-Primers (vgl. Tab. 2). Dieses Fragment wurde nach Aufreinigung in einem 3. Schritt wieder mit den ursprünglichen Primern (sense und antisense) in der PCR amplifiziert. Es entstand jeweils ein verkürztes Fragment mit den spezifischen Primerbindungsstellen des Target-DNA-Fragmentes.



Abb. 6: Teilschritte zur Herstellung des verkürzten Standards.

Sequenz	Linker-Primer 5' \rightarrow 3'
Fas	tgt gtc ttg g { $\Delta130\;bp\}$ tt tac tca agt caa cat cag
DR4	GTC GGG GTC C { Δ 140 bp} CG GTG CAC AGA GGG TGT GG
DR5	GAC CTA GCT C { Δ 137 bp} GA CCT CCT TTT CTG CTT GCG
TRAIL	gga cca gag g { $\Delta121\;bp\}gg$ tga act ggt cat cca tg
DcR1	CGT CAT CGT C $\{\Delta \ 130 \ bp\}$ GA TCA GAA CAT ACT GGA GCC

Tab. 2: Sequenzen der Linker-Primer. Die Größe der Deletion ist in Klammern angegeben.

Klonierung der Deletionsfragmente

Für die Klonierung des Fas-Deletionsfragmentes wurde der pCR-Script[™] SK(+) Klonierungs-Kit (Stratagene, Heidelberg) verwendet. Das Deletionsfragment wurde in einer PCR mit *Pfu* DNA-Polymerase (Stratagene) amplifiziert, um glatte Enden zu erhalten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel isoliert. Das Fragment wurde dann entsprechend des Standardprotokolls in den Vektor kloniert.

Für die Klonierung der anderen Deletionsfragmente wurde der pCR[®]II-TOPO Klonierungs-Kit (Invitrogen, Groningen, NL) verwendet. Dazu wurde lediglich 1 μl des 3. PCR-Schrittes (vgl. Abb. 6) entsprechend dem Standardprotokoll dem Ansatz zugesetzt.

2 μl des Klonierungsansatzes wurden in superkompetente *E. coli*-Zellen (jeweils aus dem Kit: Δ Fas: *Epicurian Coli* [®] *XL 1-Blue MRF' Kan* Supercompetente Zellen; Δ DR4, Δ DR5, Δ DcR1 und Δ TRAIL: INV α F' OneShotTM Kompetente Zellen) durch 30 s Hitzeschock bei 42 °C transformiert. Die Vorbehandlung der Zellen erfolgte jeweils nach den Angaben des Herstellers. Nach 2 min Inkubation auf Eis wurden 500 µl vorgewärmtes SOC-Medium (Kit) zugesetzt und der Ansatz 1 h bei 37 °C, 200 Upm inkubiert. Jeweils 100 µl wurden auf LB-Agar-Platten unter Zusatz von Ampicillin (100 µg/ml, pCR-ScriptTM SK(+)) oder Ampicillin/Kanamycin (je 50 µg/ml; pCR[®]II-TOPO), die mit je 40 µl IPTG (20 mg/ml) und X-gal (20 mg/ml DMSO) beschichtet wurden, ausplattiert und üN bei 37 °C bebrütet.

Selektion positiver Klone

Die erste Selektion positiver Klone erfolgte durch Blau-Weiß-Screening (Sambrook *et al.*, 1989). Weiße Klone wurden einzeln in 5 ml LB mit 100 µg/ml Ampicillin üN bei 37 °C, 200 Upm kultiviert.

<u>Schnelltest durch PCR:</u> 200 µl der üN-Kultur wurden 5 min bei 14.000 Upm, RT zentrifugiert, der Ü verworfen, das Pellet in 100 µl TE-Puffer suspendiert, 5 min bei 95 °C gekocht nochmals

5 min bei 14.000 Upm, RT zentrifugiert und der Ü in eine neues Reaktionsgefäß überführt. In einer PCR (vgl. 3.2.7) mit dem für das einklonierte Fragment spezifischen Primerpaar wurden die erhaltenen Überstände untersucht (etwa 20 Amplifizierungsschritte waren ausreichend). Die Ansätze wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, positive Klone sollten ein spezifisches Fragment ergeben.

Von 2 - 3 laut PCR-Analyse positiven Klonen wurden, wie unter 3.1.3.2 beschrieben, die Plasmide isoliert und die Sequenz wie unter 3.2.8 beschrieben analysiert, als Sequenzierungs-Primer dienten der M13 reverse- und der M13 universal-Primer, deren Bindungsstellen jeweils up- bzw. downstream der Klonierungsstelle im Plasmid liegen.

In vitro-Transkription der Standard-RNA und Berechnung der Molekülzahl

Von jeweils einem Klon mit dem entsprechenden Deletionsfragment wurde wie unter 3.1.3.3 beschrieben, die Plasmid-DNA präpariert, jedoch ohne Zusatz von RNase. Das Plasmid wurde durch Restriktion (vgl. 3.2.5) linearisiert (pCR-ScriptTM SK(+): *Not*I ; pCR[®]II-TOPO: *Bam*HI) gelelektrophoretisch aufgetrennt (vgl. 3.2.2) und aus dem Gel isoliert (vgl. 3.2.3).

1 μg der linerarisierten Plasmid-DNA diente als Matrize für die T7-RNA-Polymerase (Synthese von cRNA) während der *in vitro*-Transkription. Für die Reaktion wurde ein RNA-Transkriptions-Kit (Stratagene, Heidelberg) verwendet und die Reaktionskomponenten entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt. Nach 30 min bei 37 °C wurden nochmals 10 U T7-RNA-Polymerase zugegeben und der Ansatz für weitere 30 min inkubiert. Zur Entfernung der DNA-Matrize wurden 10 U RNase-freier DNase I zugesetzt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde, wie unter 3.2.4 beschrieben, der Ansatz mit saurem Phenol/Chloroform zur Entfernung der Enzyme extrahiert und gelelektrophoretisch (vgl. 3.2.2, Laufpuffer und Gel wurden RNase-frei angesetzt) aufgetrennt. Die RNA-Bande wurde mit einer sterilen Klinge aus dem Gel geschnitten, in einen Dialyseschlauch überführt, TE-Puffer zugegeben und der Schlauch mit Klammern verschlossen. Bei der anschließenden Elektrophorese wanderte die RNA aus dem Gel in den TE-Puffer, dieser wurde einer Extraktion mit saurem Phenol/Chloroform zur Entfernung von Agaroseresten unterzogen. Die Präzipitation der RNA erfolgte wie unter 3.2.4 beschrieben, das Pellet wurde in 40 μl DEPC-H₂O aufgenommen und die Konzentration durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt (vgl. 3.2.1).

Die Standard-RNAs wurden jeweils auf eine Konzentration von 10^{10} Moleküle/µl eingestellt, aliquotiert und bei –80 °C gelagert. Zur Stabilisierung wurden jeweils 10 ng/µl Hefe-tRNA zugesetzt. Die Standard-RNA wurde in einer RT-PCR auf die Entstehung eines PCR-Fragmentes der richtigen Größe und auf Kontamination mit DNA hin untersucht (vgl. 3.2.6).

Die Anzahl x der RNA-Moleküle wurde nach folgender Formel berechnet:

<i>x</i> =	$\frac{A_{260} \cdot V_F \cdot N_A}{n_A \cdot A_A + n_U \cdot A_U + n_G \cdot A_G + n_C \cdot A_C}$	
A260 V _F N _A n _A , r A _A , 2	UV-Lichtabsorption be Verdünnungsfaktor Avogadro-Konstante (I n_U, n_G, n_C n_U, n_G, n_C A_{U}, A_G, A_C Absorptionskoeffizient	ei 260 nm $N_A = 6,0221367 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) Nukleotide des RNA-Transkripts e der jeweiligen Nukleotide

3.3.2 Bestimmung der geeigneten Standardkonzentration

Um herauszufinden, welche Konzentration an Standard-RNA geeignet ist, um die entsprechende Molekülzahl in einer Probe zu bestimmen, wurde eine RT-PCR, wie unter 3.2.6 beschrieben, durchgeführt. Die RT enthielt die Standard-RNA in verschiedenen Verdünnungen (vorerst in 10er Schritten verdünnt) und jeweils 250 ng RNA. Anhand des erhaltenen Gebildes konnte der Äquivalenzpunkt der Kompetition ermittelt und die Verdünnungsstufen der Standard-RNA genauer definiert werden (vgl. Abb. 13). Die Verdünnungsreihe an Standard-RNA (4 - 5 Verdünnungen pro Probe) wurde für jede Versuchsreihe hergestellt, aliquotiert und bei –80 °C gelagert, zur Stabilisierung wurden stets 10 ng/µl Hefe-tRNA zugesetzt.

3.3.3 Durchführung der Standard kalibrierten kompetitiven RT-PCR

Für jede zu untersuchende RNA-Probe wurden 4 - 5 RT-Ansätze pipettiert, mit jeweils gleichen Mengen Gesamt-RNA und unterschiedlichen Mengen Standard-RNA (entsprechend der ausgetesteten Verdünnungsreihe) und in einer anschließenden PCR amplifiziert wie unter 3.2.6 beschrieben. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und fotografiert (vgl. 3.2.2).

3.3.4 Densitometrische Auswertung

Die Negative der Polaroid-Aufnahmen der Gele wurden im Durchlichtscanner eingelesen und die Intensität der amplifizierten PCR-Produkte densitometrisch (Laser Densitometer, Molecular Dynamics GmbH, Krefeld) ermittelt. Zur Korrektur der Größenunterschiede zwischen Target- und Standard-PCR-Produkt wurde der Wert des kleineren Standard-PCR-Fragmentes mit einem Korrekturfaktor (Länge des Targets/Länge des Standards) multipliziert. Es wurde jeweils der Logarithmus des Quotienten aus Standard- und Target-Wert gegen die eingesetzte Anzahl an Standard-RNA-Molekülen halblogarithmisch aufgetragen (vgl. Abb. 5). Am Äquivalenzpunkt ist das Verhältnis von Target und Standard gleich 1 (log 1 = 0), d.h. die Zahl der Standard-RNA Moleküle entspricht der Zahl der spezifischen mRNA-Moleküle in der eingesetzten Menge Gesamt-RNA.

3.4 Nachweis von Apoptose

Die in der Arbeit verwendeten Nachweise der Apoptose beruhen auf einem wichtigen biochemischen Merkmal der Apoptose, dem geordneten Abbau der Kern-DNA (Gavrieli *et al.*, 1992; Wyllie *et al.*, 1984).

3.4.1 DNA-Leiter-Assay

Aus den zu untersuchenden Proben wurde wie unter 3.1.2 beschrieben DNA isoliert. Von einer Probe wurden unterschiedliche Mengen (400-5.000 ng) DNA im Agarosegel unter Zusatz von SYBR[™] Green (vgl. 3.2.2) aufgetrennt. Das Auftreten von Apoptose in der Probe wurde durch das Vorhandensein einer für Apoptose typischen DNA-Leiter nachgewiesen. Die Quantifizierung der Apoptose erfolgte in einem DNA-Leiterscore durch densitometrische Messung aller DNA-Leiterbanden in den einzelnen Spuren des Gelbildes (Laser Densitometer, Molecular Dynamics GmbH). Es wurde der Anteil der Intensität der DNA-Leiter-Peaks an der Menge der aufgetragenen DNA [relative Einheiten/x ng DNA] ermittelt (Abb. 7).



Abb. 7: Schematische Darstellung der Bestimmung des apoptotischen DNA-Leiter-Scores. Nach Auftrennung der genomischen DNA apoptotischer Zellen entsteht das typische Bild der apoptotischen DNA-Leiter (Fragmente, die sich in ihrer Größe um ca. 180 bp unterscheiden). Die Intensität der Leiterbanden wurde densitometrisch durch Berechnung der Peakfläche (schraffiert) der einzelnen DNA-Banden mit dem Programm ImageQuant (Molecular Dynamics GmbH) ermittelt und in Relation zur aufgetrennten Menge an DNA gesetzt.

3.4.2 In situ-Nachweis von Apoptose durch TUNEL (terminal dUTP nick end labeling)

Mittels TUNEL können apoptotische Kerne *in situ* auf Gewebeschnitten detektiert werden (Gavrieli *et al.*, 1992). Dabei werden 3'-OH-Enden der degradierten DNA mit DIG-markiertem dUTP durch eine Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) markiert. Die eingebauten Nukleotide werden durch einen anti-DIG-Antikörper, gekoppelt mit Peroxidase, in einer Farbreaktion sichtbar gemacht. Für diese Untersuchungen wurde der ApopTag[®] Plus *In Situ* Apoptosis Detection Kit: Peroxidase (Oncor-Appligene, Heidelberg) benutzt.

3.4.2.1 Fixierung und Einbettung von Gewebestücken, Anfertigung von Gewebeschnitten

Die zu untersuchenden Proben wurden sofort nach Entnahme aus dem Patienten oder nach Beendigung eines Versuches in frischem 4%igem, PBS-gepufferten Formalin für mindestens 24 h bei RT fixiert. Die Entwässerung und Einbettung in Paraffin erfolgte maschinell im Routinelabor des Institutes für Pathologie der MLU. Von den Präparaten wurden Schnitte von 2 µm Dicke angefertigt und auf Objektträger (Roth, Karlsruhe) übertragen. Diese Arbeiten wurden ebenfalls durch eine routinierte Laborantin des Institutes für Pathologie durchgeführt. Die Schnitte wurden üN bei 37 °C getrocknet und bei RT gelagert.

3.4.2.2 Anfertigung und Fixierung von Kryoschnitten

Von in flüssigem Stickstoff gefrorenen Gewebestücken wurden am Gefriermikrotom Schnitte von 5 µm Dicke angefertigt und auf OT übertragen. Die Proben wurden üN bei RT getrocknet und bis zur Untersuchung bei -20 °C gelagert. Die Schnitte wurden nach dem Auftauen mit 1% Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4 für 10 min bei RT fixiert und 2x 5 min in PBS gewaschen. Es folgte eine Post-Fixierung mit Ethanol/Eisessig 2:1 für 5 min bei -20 °C, nachfolgend wurde 2x 5 min mit PBS gewaschen.

3.4.2.3 Standard-Protokoll zur TUNEL-Färbung

Paraffinschnitte wurden vor der Färbung 2x 5 min in Rotihistol (Roth, Karlsruhe) entparaffiniert, 2x 5 min in 100% Ethanol, 1x 3 min in 96% Ethanol, 1x 3 min in 70% Ethanol und 1x 5 min in PBS getaucht. Die Proben wurden mit Proteinase K (20 μ g/ml Arbeitspuffer) 15 min bei RT inkubiert und 4x 3 min mit H₂O gewaschen. Im folgenden wurden Paraffin- und Kryoschnitte gleich behandelt.

Die endogene Peroxidase wurde mit 3% H₂O₂ in PBS für 5 min bei RT blockiert und anschließend 2x 5 min mit PBS gewaschen. Weitere Reaktionsschritte wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Kontrollen wurden mitgeführt:

a) Positivkontrolle: Nach der Peroxidase-Blockierung wurde die Probe einem DNase I-Verdau unterzogen (10 min 37 °C mit 4 U DNase I (Roche Diagnotics, Mannheim)/µl 1x PCR-Puffer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), 2x 5 min in PBS gewaschen und dann dem fortlaufenden Protokoll unterzogen.

b) Negativkontrolle: Dem Reaktionspuffer wurde statt dem Enzym (TdT) H₂O zugesetzt.

Für die Farbreaktion wurde DAKO[®]Liquid DAB (DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg) verwendet, 1 ml Substrat-Lösung wurde mit 1 Tropfen DAB-Chromogen gemixt, auf den Schnitt aufgetragen, 3-4 min inkubiert und 4x 2 min mit H₂O gespült. Die Proben wurden mit Meyer's Haemalaun-Lösung (1:3 in H₂O verdünnt) für 40 s gegengefärbt, unter fließendem Wasser 10 -15 min gewaschen, getrocknet und in Aquatex (Merck, Darmstadt) eingebettet.

Proteinase K (Stock):	$20 \text{ mg/ml } \mathrm{H_2O}$	Arbeitspuffer: 10 mM	Tris/HCl pH 8,0
		5 mM	Na-EDTA
		0,5%	SDS

3.5 Western-Blot-Analysen

3.5.1 Isolierung von Gesamt-Protein aus Myokardproben

Für die Isolierung von Gesamt-Protein wurden 50 - 100 mg Gewebe in flüssigem Stickstoff zermörsert, in 500 μ l 1% SDS überführt, nochmals für 30 s mit dem Ultraturrax zerkleinert und anschließend 15 min gekocht. Unlösliche Partikel wurden jeweils durch 5 min Zentrifugation bei 8.000 Upm, RT abgetrennt. Die Proteinkonzentration wurde wie unter 3.5.2 bestimmt.

3.5.2 Messung der Proteinkonzentration

Zur Messung der Proteinkonzentration wurde der BCA Protein Assay Kit (Sigma, Deisendorf) verwendet, dessen Farbreaktion durch SDS nicht beeinflußt wird. In ein Well einer Mikrotiterplatte wurden je 10 μ l einer Proteinlösung (1:10 mit H₂O verdünnt) vorgelegt und 200 μ l der Reaktionslösung (50 Teile Reagenz A und 1 Teil Reagenz B) dazupipettiert, 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend bei einer Wellenlänge von 540 nm im Mikrotiterplattenlesegerät (Dynetech, Denkendorf) vermessen. Eine Eichkurve wurde mit BSA in einem Konzentrationsbereich von 0,02 - 2 mg/ml mitgeführt.
3.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte in SDS-Polyacrylamid-Gelen in der Gelapparatur Mini-Protean II Cell (BioRad, München) nach Laemmli (1970). Die Gele wurden als 5%ige Sammel- und 7,5 - 10%ige Trenngele mit einer Dicke von 0,75 mm gegossen. Die Proben wurden mit 1/4 Vol. Rotiload (Roth, Karlsruhe) versetzt, auf das Gel aufgetragen und 30 min bei 15 mA im Sammelgel und 50-75 min bei 30 mA im Trenngel aufgetrennt. Zur Größenbestimmung wurde der Protein-Molekulargewichts-Standard, hoher Bereich (Gibco BRL, Eggenstein) mitgeführt.

Sammelgel-Puffer:	1 M Tris/HCl pH 6,8	Lauf-Puffer:	25 mM	Tris
Trenngel-Puffer:	1 M Tris/HCl pH 8,8		192 mM	Glycin
			0,1%	SDS

3.5.4 Übertragung der Proteine auf Nitrocellulose und Anfärbung mit Ponceau S

Nach dem Gellauf wurden die aufgetrennten Proteine durch Elektroblotting in einer Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell (BioRad, München) auf Nitrocellulose (NC; Protran[®] Nitrocellulose Transfer-Membran; 0,45 μ m Porengröße von Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen. Dazu wurden 5 Lagen in Blott-Puffer getränktes Whatman-Papier, die befeuchtete NC, das PAA-Gel (Sammelgel abgetrennt) und wiederum 5 Lagen Whatman-Papier luftblasenfrei übereinander in die Apparatur geschichtet. Der Transfer erfolgte für 50 min bei 15 V und maximaler Stromstärke. Danach wurden die NC getrocknet. Der Transfer wurde durch reversible Anfärbung der Proteine mit Ponceau S überprüft. Dazu wurde die NC für 1 - 2 min in der Färbelösung inkubiert und mit destilliertem H₂O entfärbt.

Blott-Puffer: 25 mMTris/HCl pH 8,2Ponceau S-Färbelösung:0,5 g Ponceau S in192 mMGlycin1 ml Essigsäure lösen20%Methanolad 100 ml H2O

3.5.5 Coomassie-Färbung von PAA-Gelen

Nach dem Blotten wurden die verbleibenden Proteine im PAA-Gel mit Coomassie-Brillantblau angefärbt. Dazu wurden die Gele üN mit der Färbelösung unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend entfärbt. Zur Dokumentation wurden die Gele mindestens 15 min in Geltrocknungslösung inkubiert, in Folie eingelegt und in einen Rahmen zum trocknen gespannt.

Färbelösung:	0,5 g	Coomassie	Geltrocknungslösung:	10%	Essig
	50%	Methanol		10%	Glycerol
	10%	Essig			
Entfärber:	5%	Methanol			
	7%	Essigsäure			

3.5.6 Immunfärbung mit einem spezifischen Antikörper

Zur Blockierung wurde der Blott 1 h in 3% Trockenmilch in TBS-T unter leichtem Schütteln inkubiert und 3x 5 min mit TBS-T gewaschen. Der spezifische Antikörper (AK) wurde entsprechend den Angaben des Herstellers in TBS-T verdünnt (Fas-AK: 1:250; TRAIL-AK: 1:333; beide von Pharmingen, Hamburg) und der Blott unter leichtem Schütteln üN (Fas) bzw. 1,5 h (TRAIL) bei RT mit der AK-Lösung inkubiert und anschließend 3x 10 min gewaschen. Der sekundäre AK (anti-Maus-IgG, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurde 1:10.000 in TBS-T verdünnt, 40 min unter leichtem schütteln bei RT inkubiert und wiederum 3x 10 min gewaschen. Zum Nachweis der Peroxidase des sekundären Antikörpers wurde das ECL Western Blotting Analyse System (Amersham Pharmacia Biotech) nach Angaben des Herstellers benutzt. Zum Nachweis der Chemilumineszenz wurden Hyper-Filme (Amersham Pharmacia Biotech) für 1-20 min auf den Blott gelegt. Die Intensität der Banden wurde densitometrisch ermittelt (Laser Densitometer, Molecular Dynamics GmbH, Krefeld).

TBS-T: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 0,1% TWEEN 20

3.6 In Situ RT-PCR

Die *in situ* RT-PCR ermöglicht die Detektion bestimmter mRNA Spezies in Zellen eines Gewebeschnittes. Somit kann differenziert werden, welche Zellen eines heterogenen Gewebes, wie das Myokard, die gesuchte mRNA tatsächlich exprimieren. Die hier verwendete Methode wurde von Peters *et al.* (1997) entwickelt. Alle verwendeten Lösungen wurden mit DEPC (0,01%) behandelt bzw. steril angesetzt, Glasgeräte üN bei 200 °C sterilisiert.

3.6.1 Primerdesign

Äußere Primer: Zur reversen Transkription der mRNA und zur Amplifizierung der cDNA des Fas-Rezeptors wurden die Primer hum Fas S2 und AS benutzt (vgl. Tab. 1). Sie werden in Tab. 3

und Abb. 8 als Primer (1) und (2) bezeichnet und amplifizieren die cDNA von Fas und Fas-Exo6Del. Für diese PCR wurden die Primer jeweils mit einer am 5'-Ende erweiterten Sequenz (kleine Buchstaben in der Sequenz) verwendet, die zueinander komplementär ist und der Konkatemerisierung, d.h. der Bildung einer hochmolekularen DNA durch wiederholte Aneinanderreihung der PCR-Fragmente, dient (Chui *et al.*, 1992). Dies soll das Ausschwämmen der PCR-Produkte während der Waschvorgänge unterbinden.

<u>Innere Primer:</u> Für die Detektion der PCR-Fragmente wurden verschiedene innere Primer gewählt, die innerhalb der amplifizierten Sequenz liegen, sie werden in Tab. 3 und Abb. 8 als Primer (3), (4), (5) und (6) bezeichnet. Das Primerpaar (3) und (4) ermöglicht die Detektion von Fas und FasExo6Del, jedoch keine Unterscheidung beider Isoformen (vgl. Abb. 8). Um zu untersuchen, welche Zellen nun tatsächlich FasExo6Del exprimieren, wurden Primer gewählt, die das Exon 6 überspannen. Da die Detektionsreaktion nur eine einfache DNA-Polymerasereaktion (1x Denaturieren, Annealing und Amplifikation) darstellt (vgl. 3.6.4), wäre auch ein einzelner Primer ausreichend. Um aber beide DNA-Stränge zu detektieren wurde der Exon 6 überspannende Primer sowohl in sense als auch in antisense Richtung ausgewählt, ohne daß ein PCR-Produkt definierter Größe entstehen könnte.

Die Fähigkeit der äußeren Primer zur Bildung einer hochmolekularen DNA, sowie die Spezifität der inneren Primer wurden in einer PCR (vgl. 3.2.7) überprüft.

Primer (1)	CCC	саа	acc	сса	aac	CCC	GGA	CCC	AGA	ATA	CCA	AGT	G
Primer (2)	ggg	gtt	tgg	ggt	ttg	ggg	CTG	TTC	TGC	TGT	GTC	TTG	G
Primer (3)	AAC	ACT	GTG	ACC	CTT	GCA	С						
Primer (4)	TGG	CTT	CAT	TGA	CAC	CAT	TC						
Primer (5)	AAA	GAG	GAA	G-T(g aac	g aga	A AA(47					
Primer (6)	TTT	CTC	TTC	A-C	TCC	C TC	r TTC	Ч					

Tab. 3: Primer für die *in situ* RT-PCR zum Nachweis von Fas und FasExo6Del. Orientierung der Primer: $5' \rightarrow 3'$, die am 5'-Ende der Primer (1) und (2) angehängten Basen (kleine Buchstaben) dienen der Konkatemerisierung. Der Bindestrich in der Sequenz von Primer (5) und (6) kennzeichnet den Übergang von Exon 5 zu Exon 7.



Abb. 8: Lage und Orientierung der für die *in situ* RT-PCR verwendeten Primer. Primer (1) und (2) dienen der Amplifizierung der Fas-cDNA. Die Wellenlinie kennzeichnet die am 5'-Ende angebrachte Sequenz zur Konkatemerisierung. Die Primer (3), (4), (5) und (6) dienen lediglich der Detektionsreaktion. Die Primer (5) und (6) überspannen das Exon 6, das die Transmembrandomäne des Rezeptors kodiert und bei der Isoform FasExo6Del durch alternatives Spleißen entfernt wird (vgl. Abb. 10).

3.6.2 Vorbereitung der Schnitte

Von in Paraffin eingebetteten Gewebeblöcken (humanes Myokard: LV und RA, vgl. 3.4.2.1) wurden Schnitte von 4 µm Dicke angefertigt, auf Objektträger (Perkin Elmer, Weiterstadt) übertragen, 2 h bei 60 °C liegend getrocknet und bei 4 °C gelagert.

Die Schnitte wurden 3x 10 min in frischem Xylol entparaffiniert und luftgetrocknet. Um das Gewebe für die Reaktionskomponenten zugänglich zu machen, wurden die Schnitte 3 min mit 7.500 U Pepsin in 0,1 N HCl bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 gestoppt, die Schnitte in 100% Ethanol entwässert und anschließend getrocknet.

3.6.3 In Situ RT-PCR (Amplifizierung eines spezifischen Fragmentes)

Die RT-PCR wurde mittels rTth DNA Polymerase (Perkin Elmer) durchgeführt. Dieses Enzym ist zur reversen Transkription als auch zur PCR in einem Ansatz fähig.

50 µl PCR-Mastermix wurden auf den Schnitt getropft und der Reaktionsansatz mit Hilfe von Ampli Cover Clips und Ampli Cover Discs (beide Perkin Elmer) dicht verschlossen. Der OT wurde anschließend in das auf 4 °C vorgekühlte PCR-Gerät (DNA Thermal Cycler, Perkin Elmer) eingespannt.

PCR-Mastermix (50 µl-Ansatz):

DEPC-H ₂ O		26 µl
dNTPs	10 mM	1 µl
Mn(OAc) ₂	25 mM	6 µl
EZ-Puffer	5x	10 µl
RNaseOUT TM (Gibco BRL)	5 U/µl	1 µl
äußerer sense Primer	10 pmol/µl	2 µl
äußerer antisense Primer	10 pmol/µl	2 µl
rTth DNA Polymerase (Perkin Elmer)	2,5 U/µl	2 µl

Die Negativkontrolle enthielt statt der Primer DEPC-H₂O.

Es wurde folgendes Temperaturprofil gefahren:

RT:	Schritt 1:	2 min	72 °C	PCR:	Schritt 4:	3 min	90 °C
	Schritt 2:	10 min	56 °C		Schritt 5:	40 s	90 °C
	Schritt 3:	20 min	70 °C		Schritt 6:	40 s	56 °C
					Schritt 7:	30 s	70 °C;
					die Schritte	e 5-7 wu	den 55x wiederholt
					Schritt 8:	2 min	70 °C
					Schritt 9:	~	4 °C

Nach Beendigung der Reaktion wurden die Clips entfernt und die OT 5 min unter leichtem Schütteln in H₂O gewaschen und anschließend luftgetrocknet.

3.6.4 PRINS (Primed in situ labeling) zur Detektion der PCR-Produkte

In einer 2. Polymersereaktion mit Hilfe der inneren Primer (Detektions-Primer) wurden DIGmarkierte dNTPs (Roche Diagnostics, Mannheim) in die DNA eingebaut.

Es wurden wiederum 50 μ l eines Mastermixes auf den luftgetrockneten Schnitt getropft und wie unter 3.6.3 erwähnt, dicht verschlossen und in das PCR-Gerät eingespannt.

Folgendes Temperaturprofil wurde 1x gefahren:	Schritt 1:	3 min	90 °C
	Schritt 2:	1 min	56 °C
	Schritt 3:	30 s	70 °C

Nach Beendigung der Reaktion wurden die OT sofort auf Eis gelegt und die Clips entfernt.

Mastermix (50 µl-Ansatz):

DEPC-H ₂ O		33,75 µl
DIG-dNTPs Roche Diagnostics)	2 mM	1 µl
MgCl ₂	25 mM	6 µl
Stoffel-Puffer	10x	5 µl
innerer sense Primer	10 pmol/µl	2 µl
innerer antisense Primer	10 pmol/µl	2 µl
<i>Taq</i> -Stoffel DNA Polymerase (Perkin Elmer)	10 U/µl	0,25 µl

Die Negativkontrolle enthielt ebenfalls diese Primer.

3.6.5 Detektion der DIG-markierten DNA nach PRINS

Zur Detektion der DIG-markierten DNA wurde das DIG Wash and Block Buffer Set (Roche Diagnostics, Mannheim) wiefolgt verwendet:

- 5 min Waschen der OT in Puffer 1 unter leichtem Schütteln
- 20 min Blockierung in Puffer 2
- 45 min Inkubation des Anti-DIG-AP-Konjugat (1:500 in Puffer 2) in einer feuchten Kammer
- 15 min Waschen in Puffer 1
- 2 min Inkubation mit dem Detektionspuffer
- Farbreaktion mit NBT/BCIP (1 Tablette in 10 ml H₂O, Roche Diagnostics) im Dunkeln bis Blaufärbung erkennbar
- Stoppen der Reaktion mit 0,1 M Tris/HCl pH 7,4

Nach kurzem Spülen in H₂O wurden die Schnitte mit Meyer's Glyceringelatine eingedeckt und im Durchlichtmikroskop untersucht und zur Dokumentation fotografiert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Expression des Apoptose auslösenden Fas-Rezeptors und seiner Isoformen im humanen Myokard

4.1.1 Erhöhte mRNA-Expression des Fas-Rezeptors im humanen rechten Atrium (RA) mit zunehmendem Schweregrad der Herzinsuffizienz

Die Quantifizierung der mRNA für Fas im RA erfolgte mittels Standard kalibrierter, kompetitiver RT-PCR. Es wurden Proben des RA von 17 weiblichen und 40 männlichen Patienten mit unterschiedlichem Schweregrad der Herzinsuffizienz (NYHA-Stadium 1 bis 4) untersucht. Diese Patienten mußten sich aus verschiedenen Gründen, wie zum Beispiel Verlegung eines aortokoronaren venösen Bypasses, Herzklappenkorrekturen oder Septumdefekten, einem herzchirurgischen Eingriff unterziehen. Die NYHA-Klassifizierung wurde 1945 von der New York Heart Association zur Definition des funktionellen Zustandes der Patienten vorgeschlagen (Criteria Comittee New York Heart Association, 1964). Die Festlegung der NYHA-Stadien der hier untersuchten Patienten erfolgte durch den behandelnden Arzt. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 58 \pm 2 Jahre.

Es wurden pro Patient 5 RT-Reaktionen mit je 250 ng Gesamt-RNA und jeweils $6x \ 10^6$, $2x \ 10^6$, $6x \ 10^5$, $2x \ 10^5$, $6x \ 10^4$ Molekülen cRNA-Standard durchgeführt, die anschließende PCR-Amplifizierung mit den Primer Fas S2 und AS (Tab. 1 und Abb. 10) erfolgte in 37 Wiederholungen. Ein repräsentatives Gelbild eines Patienten mit NYHA 1 und NYHA 4 ist in Abb. 13 B dargestellt.

Die Quantifizierung ergab eine signifikant auf etwa das Doppelte erhöhte mRNA-Expression von Fas in Patienten mit NYHA 3,5 - 4 im Vergleich zu Patienten mit NYHA 1. Die Expression von Fas war bereits bei Patienten mit NYHA 2 signifikant im Vergleich zu denen mit NYHA 1 erhöht (Abb. 9). Die Behandlung der Patienten mit ACE (Angiotensin konvertierendes Enzym)-Inhibitoren hatte keinen Einfluß auf die Expression des Fas-Rezptors (Tab. 4).

Isoformen des Fas-Rezeptors, die durch alternatives Spleißen entstehen (Abb. 10), konnten im RA nicht quantifizierbar nachgewiesen werden.



Abb. 9: Graphische Darstellung der Ergebnisse der mRNA-Quantifizierung von Fas im humanen RA von Patienten unterschiedlicher NYHA-Stadien mit Hilfe der Standard kalibrierten, kompetitiven RT-PCR. (*p < 0,05 vs. NYHA 1)

	NYHA 3,5-4 mit ACE-I.	NYHA 3,5-4 ohne ACE-I.
	n = 17	n = 21
Fas	$1,81 \pm 0,22$	$1,80 \pm 0,20$

Tab. 4: Vergleich der mRNA-Expression von Fas im RA von Patienten mit hohem Schweregrad der Herzinsuffizienz (NYHA 3,5-4) mit und ohne ACE-Inhibitor-Therapie. Alle Werte sind in amol/µg Gesamt-RNA ± SEM angegeben. (ACE-I. = ACE-Inhibitor).

4.1.2 Detektion der mRNA löslicher Fas-Isoformen im humanen linksventrikulären Myokard mittels RT-PCR

Die mRNA von Fas und seinen alternativ gespleißten Isoformen wurde mit den Primern hum Fas S1 und AS (Tab. 1 und Abb. 10) mittels RT-PCR nachgewiesen. Spender- und insuffizientes linksventrikuläres Myokard exprimieren die mRNA des membrangebundenen Fas-Rezeptors und die der löslichen Isoform FasExo6Del, der lediglich die Transmembrandomäne fehlt (Abb. 11). Im Spendermyokard wurden beide im annähernd gleichen Verhältnis nachgewiesen, während im insuffizienten Myokard die mRNA von FasExo6Del erniedrigt war. Zusätzlich konnten im Spendermyokard, jedoch nicht im insuffizienten Myokard, Transkripte von 4 weiteren löslichen Fas-Isoformen in wesentlich geringerer Quantität detektiert werden; über 40 PCR-Amplifizierungen waren dafür notwendig. Die Identität der Isoformen wurde durch DNA-Sequenzierung für Fas, FasExo6Del, FasExo4,6Del und für FasExo3,4,6Del bestätigt. Aus der Länge der PCR-Fragmente wurde die Identität der Isoformen FasExo3,4Del und FasExo4Del gefolgert, während

die Existenz von FasExo4,7Del ausgeschlossen werden konnte. Die Häufigkeit der Transkripte von Fas und seinen Isoformen im Spendermyokard kann folgendermaßen zusammengefaßt werden: Fas \cong FasExo6Del >> FasExo3,4,6Del > (FasExo4Del) \cong Fas-Exo4,6Del \cong (FasExo3,4Del).



Abb. 10: Schematische Darstellung der humanen Fas-mRNA und ihrer alternativ gespleißten Transkripte (modifiziert nach (Cascino *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1995; Papoff *et al.*, 1996). Die leeren Boxen sind normal translatierte Bereiche mit den Nummern der jeweiligen Exons, die gestreiften Boxen zeigen Regionen mit veränderter Proteinsequenz infolge einer Verschiebung des Leserasters durch alternatives Spleißen. Signalpeptid (SP) und Transmembrandomäne (TM) sind ebenfalls hervorgehoben. Die Primerkombination und die Länge der resultierenden PCR-Fragmente sind neben den Transkripten dargestellt. Die Isoform FasExo4,7Del konnte in humanem Spendermyokard nicht gefunden werden. PCR 2 beschreibt die Fragmente bzw. Primer, die bei der Standard kalibrierten, kompetitiven RT-PCR und auch bei der *in situ* RT-PCR (vgl. 4.1.6) verwendet wurden.

4.1.3 Untersuchung von Myokard anderer Spezies auf das Vorkommen von Fas-Isoformen

Neben humanem Myokard wurde auch Normal-Myokard des linken Ventrikels von Ratte, Maus und Schwein auf die Expression der Fas-Isoform-mRNAs mittels RT-PCR untersucht. Dazu wurden Primer gewählt, die ähnlich wie hum Fas S1 und AS einen großen Teil des kodierenden Bereiches überspannen. Es konnte jedoch bei keiner der genannten Spezies neben der mRNA des Fas-Rezeptors eine alternativ gespleißte Isoform gefunden werden (Abb. 12). Für das Kaninchen wurde ebenfalls im Verlauf der Arbeit eine quantitative PCR zur Analyse von Fas im Myokard etabliert. Dafür wurden Primer gewählt, die Exon 6 analog zur humanen Sequenz überspannen. Auch im Kaninchen konnten keine alternativ gespleißten Transkripte des Fas-Rezeptors im gesunden Myokard detektiert werden (vgl. Abb. 37). Damit sind diese gängigen Labortiere für die Untersuchung des alternatives Spleißens von Fas im Myokard ungeeignet.



Abb. 11: Detektion der mRNA von Fas und seinen Isoformen im linksventrikulären humanen Myokard von Spender- und terminal insuffizienten Herzen durch RT-PCR. Die resultierenden Banden sind mit weißen Pfeilspitzen markiert, ihre Größe und Reihenfolge entspricht der in Abb. 10 unter PCR 1 dargestellten. Im Spendermyokard konnten neben Fas 6 verkürzte Isoformen detektiert werden, während im insuffizienten Myokard nur Fas und geringe Mengen von FasExo6Del nachweisbar waren. M = 100bp-Leiter.



Abb. 12: Analyse der Expression von Fas-mRNA im linksventrikulären humanen Spendermyokard, sowie im Normalmyokard von Schwein, Ratte und Maus. Mittels RT-PCR wurde ein für Fas spezifisches cDNA-Fragment in allen untersuchten Spezies amplifiziert, verkürzte Isoformen konnten nur im humanen Myokard gefunden werden. Schwach erkennbare Banden bei Ratte und Schwein wurden sequenziert und erwiesen sich als unspezifisch. M = 100 bp-Leiter.

4.1.4 Verringerte mRNA-Expression der antiapoptotischen Isoform FasExo6Del im terminal insuffizienten, humanen linksventrikulären Myokard

Die Quantifizierung der mRNA für Fas und FasExo6Del erfolgte mittels Standard kalibrierter, kompetitiver RT-PCR. Die Untersuchung wurde an linksventrikulärem Myokard von 8 Spenderherzen (Durchschnittsalter der 3 weiblichen und der 5 männlichen Spender 34 ± 6 Jahre) und 24 terminal insuffizienten Herzen durchgeführt (Durchschnittsalter der 2 weiblichen und der 22 männlichen Patienten 55 ± 2 Jahre, 12 litten an koronarer Herzkrankheit (KHK) und 12 waren an einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM), darunter die beiden Frauen). Die durchschnittliche Auswurffraktion (EF = ejection fraction) von 17 dieser Patienten betrug $26,4 \pm 2\%$. Dieser Wert dient der Beurteilung der kardialen Pumpfunktion und wurde durch Echokardiographie in Voruntersuchungen der Patienten durch den behandelnden Kardiologen bestimmt. Die EF beschreibt den Quotienten: Schlagvolumen/enddiastolisches Volumen erweitert um den Faktor 100. Unter Normalbedingungen liegt die EF bei 70%, im Verlauf einer Herzinsuffizienz sinkt sie auf bis zu 20% ab. Leider lag uns dieser wichtige Funktionsparameter nicht von allen Patienten vor (Hellige, 1996).

In allen Patientenproben konnte die mRNA für Fas mittels RT-PCR detektiert werden. Für die Quantifizierung konnten dieselben Verdünnungsstufen wie bei den Untersuchungen im RA verwendet werden (vgl. 4.1.1 und Abb. 13 A). Die Quantifizierung ergab eine leichte, jedoch statistisch nicht relevante (p = 0,13) Erhöhung der Fas-mRNA im insuffizienten im Vergleich zum Spendermyokard (Abb. 14 A), während die mRNA der löslichen Isoform FasExo6Del im erkrankten Myokard um das 2 - 3fache signifikant erniedrigt war (Abb. 14 B). Für das Verhältnis beider mRNAs Fas/FasExo6Del (pro/antiapoptotisch) ergab sich eine signifikante Erhöhung um das 3fache im insuffizienten linken Ventrikel (Abb. 14 C). Es konnten keine Unterschiede in der Expression zwischen Patienten, die an einer DCM oder KHK erkrankten, beobachtet werden, auch die Behandlung der Patienten mit ACE-Inhibitoren hatte keinen Einfluß auf die Expression der Fas- oder FasExo6Del-mRNA (Tab. 5). Es konnte eine signifikante Abhängigkeit der EF der Patienten vom Verhältnis Fas/FasExo6Del ermittelt werden: Patienten mit einer höheren EF zeigten auch ein niedrigeres Verhältnis Fas/FasExo6Del (Abb. 14 D).





Ergebnisse

	DCM	KHK	mit ACE-I.	ohne ACE-I.
	n = 12	n = 12	n =16	n = 8
Fas	$1,09 \pm 0,14$	1,28 ± 0,16	$1,25 \pm 1,40$	$1,06 \pm 0,27$
FasExo6Del	$0,28\pm0,05$	0,31 ± 0,04	$0,30 \pm 0,04$	$0,29 \pm 0,05$
Fas/FasExo6Del	$4,23 \pm 0,26$	$4,54 \pm 0,51$	4,56 ± 0,33	$4,05 \pm 0,55$

Tab. 5: Vergleich der mRNA-Expression von Fas und FasExo6Del im LV von Patienten, die an einer DCM (Dilatative Kardiomyopathie) oder an KHK (Koronare Herzkrankheit) erkrankt waren sowie mit und ohne ACE-Inhibitor-Therapie. Alle Werte sind in Mean \pm SEM und die Expression von Fas und FasExo6Del in amol/µg Gesamt-RNA angegeben. ACE-I. = ACE-Inhibitor.



Abb. 14: Graphische Darstellung der Ergebnisse der mRNA-Quantifizierung von Fas (A) und Fas-Exo6Del (B) und des proapoptotischen Verhältnisses Fas/FasExo6Del (C) im humanen linksventrikulären Myokard durch Standard kalibrierte, kompetitive RT-PCR. Das Verhältnis Fas/FasExo6Del korrelierte negativ mit der Auswurffraktion (EF) in den Patienten (D). (*p < 0.05; **p < 0.001 vs. Spender).

Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz bietet die Implantation eines ventrikulären Unterstützungssystems (VAD, Kunstherz) hämodynamische Entlastung zur Überbrückung der Zeit, bis ein geeignetes Spenderherz zur Transplantation zur Verfügung steht. Das Herz wird dadurch entlastet und erfährt umfassende Veränderungen, die auch zu Funktionsverbesserungen des Myokards führen (Loebe et al., 1999). Um eine mögliche Veränderung der mRNA-Expression von Fas und FasExo6Del während der Entlastungsphase zu detektieren, wurde wiederum eine Standard kalibrierte, kompetitive RT-PCR zur Quantifizierung durchgeführt. Die Untersuchung wurde an linksventrikulärem Myokard von 10 Patienten durchgeführt: dabei wurde jeweils eine prä-VAD-Probe, die bei der Implantation des VAD entnommen wurde, und eine post-VAD-Probe des Myokards desselben Patienten nach Transplantation zum direkten Vergleich der Situation vor und nach Entlastung analysiert. Es wurden folgende Geräte verwendet: TCI HeartMate (Thermo Cardiosystems, Inc), Novacor (Baxter Healthcare Corp, Novacor Division) und Thoratec (Thoratech Laboratories, Inc). Die Dauer der Unterstützung durch ein VAD, die von die Verfügbarkeit an Spenderherzen bestimmt wird, war sehr unterschiedlich bei den einzelnen Patienten (Tab. 6). Das Durchschnittsalter der 10 männlichen Patienten betrug 53 ± 4 Jahre, 7 waren an einer DCM, 2 an einer KHK und 1 Patient an einer hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) erkrankt. Die durchschnittliche Auswurffraktion (EF) der Patienten vor Einbau des VAD betrug $24.0 \pm 1.3\%$.

Bei diesen Untersuchungen wurden dieselben PCR-Bedingungen wie unter 4.1.1 angegeben verwendet. Die Werte für die Fas-mRNA vor und nach VAD unterlagen bei einzelnen Patienten starken Schwankungen, blieben aber durchschnittlich unverändert. Die mRNA-Expression von FasExo6Del stieg bei einigen Patienten mit zunehmender Dauer der Unterstützung durch das VAD an, blieb aber im Mittel auf der Ebene des insuffizienten Myokards (vgl. 4.1.4). Das proapoptotische Verhältnis Fas/FasExo6Del verringerte sich in Patienten nach etwa 57 Tagen Entlastung deutlich um ca. 25-45%. Die Abnahme des Verhältnisses Fas/FasExo6Del korrelierte dabei mit der Unterstützungsdauer bei den DCM-Patienten (p < 0,05), erreichte jedoch nicht den Wert der Spenderherzen (Abb. 15).

Die beiden KHK-Patienten verhielten sich trotz etwa gleicher Unterstützungsdauer vollkommen unterschiedlich das Verhältnis Fas/FasExo6Del betreffend. Alle Ergebnisse sind in Tab. 6 und Abb. 15 zusammengefaßt.

Patient	Diagnose	VAD	Dauer des	Fas		FasExo6Del				Fas/FasExo6Del		
			VAD (Tage)	prä	post	∆ in %	prä	post	∆ in %	prä	post	∆in %
А	DCM	LVAD	36	1,46	0,69	-52,7	0,36	0,13	-63,9	4,06	5,31	30,9
В	DCM	LVAD	42	1,17	1,19	1,7	0,37	0,26	-29,7	3,16	4,58	44,7
С	HCM	LVAD	57	1,50	1,46	-2,7	0,12	0,16	33,3	12,50	9,13	-27,0
D	DCM	LVAD	64	0,93	1,60	72,0	0,06	0,14	133,3	15,50	11,43	-26,3
Е	DCM	LVAD	116	1,36	1,72	26,5	0,25	0,54	116,0	5,44	3,19	-41,4
F	DCM	L/RVAD	117	1,00	1,22	22,0	0,17	0,38	123,5	5,88	3,21	-45,4
G	DCM	LVAD	140	0,74	0,59	-20,3	0,14	0,14	0,0	5,29	4,21	-20,3
Н	DCM	LVAD	169	1,53	1,58	3,3	0,21	0,38	81,0	7,29	4,16	-42,9
Ι	КНК	L/RVAD	143	1,36	0,39	-71,3	0,28	0,15	-46,4	4,86	2,60	-46,5
J	КНК	LVAD	144	1,38	1,32	-4,3	0,42	0,26	-38,1	3,29	5,08	54,5
Mean			102,80	1,24	1,18	-2,6	0,24	0,25	30,9	6,73	5,29	-12,0
SEM			15,35	0,09	0,15	12,7	0,04	0,04	24,3	1,29	0,89	12,5

Tab. 6: Ergebnis der Quantifizierung von Fas- und FasExo6Del-mRNA vor und nach Einbau eines VAD mittels Standard kalibrierter, kompetitiver RT-PCR in den einzelnen Patienten. Die prozentuale Änderung der Werte zwischen prä- und post-VAD sind jeweils für Fas, FasExo6Del und das Verhältnis Fas/FasExo6Del angegeben. Alle Werte für Fas und FasExo6Del sind in amol/µg Gesamt-RNA dargestellt. prä = vor VAD-Entlastung (Implantation); post = nach VAD-Entlastung (Transplantation); LVAD = linksventrikuläres VAD; L/RVAD = links- und rechtsventrikuläres VAD.



Abb. 15: (A) Korrelation der Veränderung des proapoptotischen Verhältnisses Fas/FasExo6Del mit der Dauer der Unterstützung durch ein VAD und (B) Vergleich des Verhältnisses Fas/FasExo6Del vor und nach VAD zum Spendermyokard. Die Werte der KHK-Patienten sind mit einem Dreieck im Diagramm dargestellt und gingen nicht in die Korrelation und das Säulendiagramm (B) ein. prä = vor VAD-Entlastung (Implantation); post = nach VAD-Entlastung (Transplantation). (* p < 0,05 vs. Spender).

4.1.6 Kardiomyozyten exprimieren Fas und dessen Isoform FasExo6Del

Das Myokard ist ein heterogenes Gewebe und besteht nur zu etwa 30% aus Kardiomyozyten, die jedoch über 75% der Zellmasse ausmachen. Weitere Zelltypen sind Fibroblasten, welche die Gewebestabilität bedingen, sowie Zellen des weit verzweigten Koronargefäßsystems, die die Versorgung der Muskelzellen gewährleisten. Fas-mRNA exprimierende Zellen können durch *in situ RT-PCR* auf Gewebeschnitten des Myokards identifiziert werden. Dazu wurde zuerst die Fas-mRNA auf dem Schnitt mit einem spezifischen Primer in cDNA umgeschrieben und nachfolgend mit einem spezifischen Primerpaar (äußere Primer, vgl. 3.6.1) amplifiziert. Im Anschluß wurden mit Hilfe eines weiteren Primerpaares, das innerhalb der amplifizierten Sequenz liegt (innere Primer, vgl. 3.6.1), DIG-markierte dNTPs eingebaut, die wiederum durch Antikörper detektiert wurden. Der letzte PCR-Schritt ermöglichte zudem eine Unterscheidung von Fas- und FasExo6Del-PCR-Produkten durch die Spezifität der Primer. Zur Detektion von FasExo6Del wurden Exon 6-überspannende Primer gewählt. Die Lage und Orientierung der Primer sind in Abb. 8 dargestellt.

Eine Quantifizierung der mRNA-Expression konnte mit dieser Methode nicht erfolgen, da für die Amplifizierung 55 PCR-Zyklen notwendig waren. Der lineare Amplifizierungsbereich, in dem Quantifizierungen möglich sind, wurde somit schon weit überschritten.

4.1.6.1 Test der Primer

Für den *in situ* Nachweis der Fas-mRNA wurden zunächst die Primer (1) und (2) (äußere Primer, Abb. 8) auf ihre Fähigkeit zur Bildung einer hochmolekularen DNA (Konkatemerisierung) während der PCR-Amplifizierung hin untersucht. Nach 50 Amplifizierungsschritten in einer RT-PCR zeigte sich ein deutlicher DNA-Schmier, der typisch für die Bildung der Konkatemere ist, dieser Effekt wurde nach 55 Zyklen noch deutlicher (Abb. 16 A). Genomische DNA wurde ebenfalls als Template für die Amplifizierung eingesetzt, bei der jedoch kein spezifisches Fragment nachgewiesen werden konnte. Die inneren Primer (3) und (4) amplifizierten in einer PCR ein Fragment mit der erwarteten Größe von 350 bzw. 288 bp für Fas bzw. FasExo6Del (Ergebnis nicht dargestellt).

Um FasExo6Del in einer PCR von Fas unterscheiden zu können, wurden die Exon 6überspannenden Primer (5) und (6) gewählt und in einer PCR mit Plasmid-DNA, in die jeweils die PCR-Fragmente für Fas oder FasExo6Del kloniert wurden, als Template getestet. Die Spezifität von Primer (6) für FasExo6Del konnte durch Neusynthese desselben Primers nochmals erhöht werden, jedoch vom 5'- und 3'-Ende um einige Basen verkürzt als 17- bzw. 14mer (Abb. 16 B). Mit Fas als Template konnte dann keine Bande mehr in der PCR detektiert werden, Primer (6) erwies sich demnach als spezifisch für FasExo6Del, während Primers (5) diese Spezifität in keiner der verkürzten Formen zeigte (Abb. 16 B). Daher konnte die Detektionsreaktion von Fas-Exo6Del nur mit Primer (6) auf dem Schnitt erfolgen.



Abb. 16: Überprüfung der Primer für die *in situ* **RT-PCR.** (A) Zur Untersuchung der äußeren Primer wurden Gesamt-RNA eines humanen LV nach RT und humane gDNA in einer PCR über 40-55 PCR-Zyklen amplifiziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden jeweils Primer mit und ohne Konkatemersequenz (KS) parallel verwendet. Neben der 458 bp großen Bande für Fas war auch die 395 bp große Bande für FasExo6Del schwach erkennbar (weiße Pfeilspitze), dieselben Primer amplifizierten mit gDNA als Template kein Fragment. (B) Die verkürzten Varianten der Primer (5) und (6) wurden in einer PCR mit Fas oder FasExo6Del als Template getestet. Sie wurden jeweils als Paar mit Primer (1) oder (2) eingesetzt. Während Primer (5) in allen Verkürzungen ein Fragment von etwa 260 bp ergab, erwies sich der Primer (6) als 17- und 14mer spezifisch für FasExo6Del und ergab mit FasExo6Del als Template ein etwa 155 bp großes Fragment, jedoch nicht mit Fas als Template. M = 100 bp-Leiter.

4.1.6.2 Detektion der Fas-mRNA in Kardiomyozyten

Zunächst wurden die Gewebeschnitte auf die Expression der Fas-mRNA hin untersucht. Als FasmRNA exprimierende Zellen im LV als auch im RA konnten eindeutig Kardiomyozyten bestimmt werden (Abb. 17 A, B und C). Im Zytoplasma aller Kardiomyozyten zeigte sich eine deutliche Blaufärbung (Farbreaktion der Alkalischen Phosphatase des DIG-Antikörpers mit dem Substrat NBT/BCIP), während die DNA im Nukleus keine unspezifischen Reaktionen zeigte und ungefärbt blieb. Bei den Kardiomyozyten zeichnete sich zudem die für Muskelzellen typische Querstreifung (Z-Banden) ab, die eine eindeutige Bestimmung des Zelltypes erleichterte (Abb. 17 B). Zellen des Bindegewebes, die besonders im RA ausgeprägt sind, zeigen im Vergleich zu den Kardiomyozyten nur eine schwache Blaufärbung. Hingegen sind Endothelzellen, welche die Innenwände der Kapillargefäße auskleiden deutlich blau gefärbt (Abb. 17 D) und tragen somit zur Gesamtexpression von Fas im Myokard bei. In allen Versuchen wurde stets eine Negativkontrolle mitgeführt. Diese Negativkontrolle wurden ohne Primer (1) und (2) in der RT-PCR durchgeführt, enthielt dann aber die jeweiligen Primer für die Detektionsreaktion (Abb. 17 F, nur für Primer (6) dargestellt).

Die mRNA von FasExo6Del konnte mit Hilfe des spezifischen Primers (6) in den Kardiomyozyten detektiert werden (Abb. 17 E). Bei der verwendeten Probe handelte es sich um Spendermyokard. Die Färbung war gleichmäßig über den gesamten Schnitt. Zellen, die Fas exprimieren, exprimieren auch die lösliche Isoform FasExo6Del.



Abb. 17: Detektion der Fas und FasExo6Del-mRNA exprimierenden Zellen im humanen Myokard. Der Nachweis von Fas-mRNA nach *in situ* RT-PCR im LV (A und B) und RA (D) zeigt sich durch die deutliche Blaufärbung des Zytoplasmas der Kardiomyozyten (K), zur Detektion wurden die Primer (3) und (4) benutzt. Die typische Querstreifung (*Z-Banden = Z*) der Kardiomyozyten zeichnet sich deutlich in der Vergrößerung ab (B). Die DNA des Kerns (N) ist ungefärbt und zeichnet sich etwas heller ab. Die im Vergleich zu den Kardiomyozyten winzigen Endothelzellen (*EZ*) der Kapillargefäße sind ebenfalls blau gefärbt und mit Pfeilen markiert (C). Die Detektionsreaktion von FasExo6Del konnte mit Primer (6) erfolgen, auch hier zeigen die Kardiomyozyten eine deutliche Blaufärbung (E). Die zugehörige Negativkontrolle blieb ungefärbt. Da keine Gegenfärbung des Schnittes erfolgte, sind hier nur schwache Konturen der Zellen zu erkennen (F). *G = Glanzstreifen, B = Bindegewebe*.

4.1.7 Untersuchungen zur Proteinexpression des Fas-Rezeptors im humanen Myokard

Die Expression des Fas-Rezeptors auf Proteinebene im humanen Myokard wurde im Western-Blot analysiert. Dazu wurde Gesamt-Protein myokardialer Proben des RA und des LV in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Die Immunfärbung erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper mit Spezifität für humanes Fas und einer Signalverstärkung durch das ECL-Detektionssystem.

Im Western-Blot konnte eine sehr schwache Proteinbande von etwa 45 kD im RA als auch im LV detektiert werden (Abb. 18), die dem Molekulargewicht des membrangebundenen Rezeptors entspricht (Itoh *et al.*, 1991). Eine Negativkontrolle bestätigte die Spezifität des Antikörpers. Wegen der großen Proteinmenge (100 µg) wurden außerdem viele unspezifische Banden durch den sekundären Antikörper (Anti-Maus-IgG) markiert. Als Positivkontrolle wurde Gesamt-Protein von HUVEC (human umbilical vein endothelial cells), die Fas konstitutiv exprimieren, mitgeführt.

Die Proteinmenge an Fas im Myokard erwies sich allerdings als zu gering, um eine eindeutige Quantifizierung der Proteinexpression trotz ECL-Verstärkersystems durchzuführen.



Abb. 18: Western-Blot-Analyse des Fas-Rezeptors im humanen Myokard. Es wurden jeweils 100 μ g Gesamt-Protein einer humanen RA- bzw. LV-Probe und 20 μ g Gesamt-Protein von HUVEC pro Bahn aufgetragen. Nach dem Blotten wurden die Bahnen halbiert und jeweils mit dem spezifischen und dem sekundären Antikörper (*F*) oder nur mit dem sekundären Antikörper (*K*) inkubiert. Die spezifischen Banden des Fas-Rezeptors sind mit einer roten Pfeilspitze markiert. Im LV konnte lediglich eine sehr schwache Proteinbande für Fas detektiert werden.

4.2 Bestimmung der Expression des Liganden TRAIL und seiner Rezeptoren im humanen linksventrikulären Myokard

Die Quantifizierung der mRNA-Expression von TRAIL, DR4, DR5 und DcR1 erfolgte durch Standard kalibrierte, kompetitive RT-PCR. Diese Untersuchungen wurden an linksventrikulärem Myokard von 10 Spenderherzen (Durchschnittsalter des 1 weiblichen und der 9 männlichen Spender 34 \pm 4 Jahre) und 26 terminal insuffizienten Herzen (Durchschnittsalter der 4 weiblichen und der 22 männlichen Patienten 53 \pm 2 Jahre, 12 waren an einer KHK, und 14 an einer DCM, darunter die 4 Frauen, erkrankt) durchgeführt. Die EF der Patienten betrug durchschnittlich 26,1 \pm 2%.

Es wurden pro Patient 4 RT-Reaktionen mit je 250 ng Gesamt-RNA und den jeweiligen Verdünnungen der Standard-cRNA hergestellt. Die eingesetzten Mengen an Standard-cRNA-Molekülen, sowie die optimierte Anzahl der PCR-Amplifizierungen sind in Tab. 7 zusammengefaßt.

Target	Moleküle Standard-cRNA	Zyklen
DR4	$6x \ 10^6, \ 2x \ 10^6, \ 6x \ 10^5, \ 2x \ 10^5$	36
DR5	6x 10 ⁷ , 2x 10 ⁷ , 6x 10 ⁶ , 2x 10 ⁶	36
DcR1	$2x \ 10^6, \ 6x \ 10^5, \ 2x \ 10^5, \ 6x \ 10^4$	38
TRAIL	6x 10 ⁸ , 2x 10 ⁸ , 6x 10 ⁷ , 2x 10 ⁷	34

Tab. 7: Zusammenfassung der optimierten Bedingungen zur Quantifizierung einzelner Komponenten des TRAIL-Systems durch Standard kalibrierte, kompetitive RT-PCR aus jeweils 250 ng Gesamt-RNA aus linksventrikulärem Myokard.

4.2.1 mRNA-Expression der Rezeptoren DR4, DR5 und DcR1 und dessen Liganden TRAIL

Die Quantifizierung der mRNA für den Apoptose auslösenden Rezeptor DR4 und des Köderrezeptors DcR1 ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen normalem und insuffizientem Myokard. Die Primer für die Quantifizierung des Rezeptors DR5 wurden so gewählt, daß zwischen beiden Isoformen, die durch alternatives Spleißen entstehen (Screaton *et al.*, 1997), unterschieden werden konnte. Beide Isoformen von DR5 wurden im linksventrikulären Myokard nachgewiesen (Abb. 19). Da keine Isoform-Verschiebung zwischen normalem und insuffizientem Myokard beobachtet werden konnte (Ergebnis nicht dargestellt), wurden die erhaltenen Werte addiert und als gesamte DR5-Expression angegeben. Es zeigte sich, daß DR5 im insuffizienten Myokard um etwa das 4fache signifikant erniedrigt war im Vergleich zum Spendermyokard. Die mRNA-Expression von DR4 und DR5 war in Patienten mit einer KHK deutlich höher als in Patienten mit einer DCM, während die Expression von DcR1 keinen Unterschied zwischen beiden Patientengruppen zeigte. Die Behandlung mit ACE-Inhibitoren hatte keinen Einfluß auf die Expression dieser Rezeptoren. Die Ergebnisse sind in Tab. 8 und Abb. 20 A-C zusammengefaßt. Es zeigte sich, daß die mRNA des Köderrezeptors DcR1 durchschnittlich um etwa das 4fache niedriger lag, als die von DR4 und um etwa das 45fache niedriger als DR5 gemessen an der Molekülzahl.



Abb. 19: Quantifizierung der mRNA-Expression beider Isoformen von DR5 im humanen LV. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Gelbild der Standard kalibrierten, kompetitiven RT-PCR für Proben des LV von zwei verschiedenen Patienten. Die obere Bande präsentiert DR5B (626 bp) und die mittlere Bande DR5A (539 bp, ohne das alternativ gespleißte 87 bp-lange Exon). Beide Isoformen waren in allen Patienten detektierbar. Die unterste Bande zeigt den verkürzten Standard (402 bp). M = 100 bp-Leiter.

Im insuffizienten Myokard war die mRNA-Expression des Apoptose auslösenden Liganden TRAIL signifikant im Vergleich zum Spendermyokard auf die Hälfte erniedrigt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen KHK- und DCM-Patienten beobachtet werden, und auch die Behandlung mit ACE-Inhibitoren zeigte keinen Einfluß auf die Expression. Die Ergebnisse sind in Tab. 8 und Abb. 20 D dargestellt.

Die mRNA-Expression des Apoptose auslösenden Liganden TRAIL war im LV wesentlich höher als die der zugehörigen Rezeptoren DR4, DR5 und DcR1. Sie lag durchschnittlich um etwa das 10- bis 1.000fache höher gemessen an der Molekülzahl.



Abb. 20: Graphische Darstellung der Ergebnisse der mRNA-Quantifizierung einzelner Komponenten des TRAIL-Systems im humanen linksventrikulären Myokard durch Standard kalibrierte, kompetitive RT-PCR. (A) DR4; (B) DR5; (C) DcR1 und (D) TRAIL. (*p < 0.05; **p < 0.001; (*) 0.1 > p > 0.05 vs. Spender)

	DCM	KHK	mit ACE-I.	ohne ACE-I.
	n = 14	n = 12	n =18	n = 8
DR4	0,73 ± 0,10	1,10±0,16*	0,86 ± 0,16	0,90 ± 0,12
DR5	4,23 ± 0,59	8,06 ± 1,69*	6,91 ± 1,60	5,59 ± 1,11
DcR1	0,31 ± 0,05	0,21 ± 0,05	$0,\!24 \pm 0,\!07$	0,28 ± 0,04
TRAIL	234,1 ± 65,3	$200,2 \pm 27,1$	182,2 ± 36,6	234,6 ± 50,8

Tab. 8: Vergleich der Expression von DR4, DR5, DcR1 und TRAIL im LV von Patienten die an einer DCM oder KHK erkrankt waren, sowie mit und ohne ACE-Inhibitor-Therapie. Alle Werte sind in amol/µg Gesamt-RNA \pm SEM angegeben. (*p < 0,05 vs. DCM; ACE-I. = ACE-Inhibitor).

4.2.2 Die Proteinexpression des Apoptose auslösenden Liganden TRAIL ist im terminal insuffizienten linken Ventrikel erhöht

Die Bestimmung der Proteinexpression des Liganden TRAIL im humanen Myokard erfolgte im Western-Blot. Dazu wurde Gesamt-Protein aus humanem LV in der SDS-PAGE auftrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Die Immunfärbung erfolgte mit einem für humanes TRAIL spezifischen monoklonalen Antikörper und dem ECL-Detektionssystem.

Es konnte eine einzelne Proteinbande von etwa 32 kD detektiert werden (Abb. 21), die dem Molekulargewicht des membrangebundenen Liganden entspricht (Mariani und Krammer, 1998).



Abb. 21: Nachweis und Quantifizierung von TRAIL im Western-Blot. (A) Von einer humanen linksventrikulären Probe wurden 5, 10, 15 und 20 μ g Gesamt-Protein im Western-Blot analysiert. Die ca. 32 kD große Bande ist spezifisch für membrangebundens TRAIL. Die Hälfte der letzten Spur wurde als Kontrolle lediglich mit dem sekundären AK inkubiert (K₀). (B) Densitometrische Bestimmung der Intensität der Proteinbanden. (C) Graphische Darstellung der linearen Beziehung der eingesetzten Proteinmenge zur Bandenintensiät.

Die Quantifizierung der TRAIL-Proteinexpression wurde an linksventrikulären Myokardproben von 10 Normalherzen und 18 terminal insuffizienten Herzen (9 KHK, 9 DCM) durchgeführt. Dazu wurden 12,5 µg Gesamt-Protein eingesetzt; eine Menge an Protein, die eine optimale Quantifizierung erlaubt (Abb. 21). Die Gelbeladung wurde durch Coomassie-Färbung (Abb. 22

B) und der gleichmäßige Proteintransfer nach dem Elektroblot durch Ponceau S-Färbung (nicht dargestellt) überprüft. Zum Vergleich der einzelnen Blots, wurde jeweils ein Standardpatient mitgeführt.

Die Quantifizierung in den einzelnen Patientenproben ergab eine signifikant erhöhte Expression des Liganden TRAIL im terminal insuffizienten linksventrikulären Myokard im Vergleich zum Spendermyokard, wie auch schon Abb. 22 A erkennen läßt. Die Behandlung der Patienten mit ACE-Inhibitoren hatte keinen Einfluß auf die Proteinexpression von TRAIL. Die Werte sind in Tab. 9 und Abb. 23 A zusammengefaßt.



Abb. 22: Quantifizierung der Proteinexpression von TRAIL in humanem linksventrikulären Myokard. (A) Darstellung einer repräsentativen Western-Blot-Analyse von 5 Proben insuffizienten Myokards, 3 Proben Spendermyokard und 1 Standardpatienten (SP). (B) Überprüfung der Gelbeladung durch Coomassie-Färbung des PAA-Gels.



Abb. 23: Graphische Darstellung des Ergebnisses der Quantifizierung der Proteinexpression des Liganden TRAIL im humanen linksventrikulären Myokard durch Western-Blot. (*p < 0,005).

Ergebnisse

DCM	КНК	mit ACE-I.	ohne ACE-I.
n = 9	n = 9	n =12	n = 6
$10,71 \pm 1,43$	13,19 ± 1,61	$11,6 \pm 1,2$	$12,6 \pm 2,4$

Tab. 9: Vergleich der Proteinexpression von TRAIL in humanem linksventrikulären Myokard von DCM- und KHK-Patienten, sowie mit und ohne ACE-Inhibitor-Therapie. Alle Werte sind in relativen Einheiten ± SEM angegeben.

4.3 Analyse der mRNA-Expression von TNF-RI, FasL sowie bekannter Komponenten der apoptotischen Signalkaskade der "Death Domain"-Rezeptoren im humanen Myokard

Die Bestimmung der mRNA-Expression von TNF-RI, seinem intrazellulären Adapterprotein TRADD, dem Apoptose auslösenden Fas-Liganden (FasL) sowie von Elementen der Signalkaskade des Fas-Rezeptors: FADD (Fas-assoziertes DD-Protein), Caspase-8 und FLIP (FLICEinhibierendes Protein), dessen zwei Isoformen FLIP-L und -S durch alternatives Spleißen entstehen, erfolgte in einer semiquantitativen RT-PCR. Zur Normalisierung der Werte wurde das "housekeeping"-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) verwendet. Alle Sequenzen waren aus der Datenbank bekannt. Zunächst wurde für die genannten Gene die geeignete Zyklenzahl für die Amplifizierung in der RT-PCR mit dem spezifischen Primerpaar (vgl. Tab. 1) bestimmt, um nicht die Plateau-Phase der Amplifizierung zu erreichen (Abb. 24). Die optimalen Zyklenzahlen sind in Tab. 10 zusammengefaßt; sie geben auch einen Hinweis auf die relativen Mengen an Transkripten im Gewebe. Die Spezifität der erhaltenen PCR-Fragmente konnte durch DNA-Sequenzierung bestätigt werden.

Die Untersuchung wurde an linksventrikulärem Myokard von 6 Spenderherzen (Durchschnittsalter der 2 weiblichen und der 4 männlichen Spender 40 ± 5 Jahre) und 12 terminal insuffizienten Herzen (Durchschnittsalter der 2 weiblichen und der 10 männlichen Patienten 53 \pm 3 Jahre, 6 waren an einer KHK, und 6 an einer DCM, darunter die 2 Frauen, erkrankt) durchgeführt. Die EF der Patienten betrug im Durchschnitt 23 \pm 3%. Die Auswahl von nur 18 Patienten hatte technische Gründe.

In allen Proben konnte die mRNA von TNF-RI, TRADD, FADD, Caspase-8 und beiden FLIP-Isoformen nachgewiesen werden (Abb. 25). Die Intensität der PCR-Bande für GAP-DH war in allen Proben in etwa gleich und daher für die Normalisierung in der semiquantitativen RT-PCR geeignet. Für keines der genannten Gene konnten Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen Spender- und insuffizienten Myokard gefunden werden. Auch zwischen Patienten, die an einer KHK bzw. einer DCM erkrankt waren, konnten wie schon im Gelbild in Abb. 25 erkennbar, keine Unterschiede festgestellt werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 11 zusammengefaßt. Die Behandlung der Patienten mit ACE-Inhibitoren hatte keinen Einfluß auf die mRNA-Expression im Vergleich zu denen ohne diese Therapie (Ergebnisse nicht dargestellt).

Es fällt auf, daß die Adapterproteine FADD und TRADD im Myokard nur relativ niedrig exprimiert waren, für ihren Nachweis in der RT-PCR waren 36 bzw. 37 Amplifizierungen notwendig. Hingegen waren TNF-RI, Caspase-8 und FLIP deutlich höher exprimiert; für ihren Nachweis waren ca. 30 Zyklen ausreichend (Tab. 10).

Die mRNA des FasL konnte nur in einzelnen Proben detektiert werden und war insgesamt sehr schwach im linksventrikulären Myokard exprimiert, im Spendermyokard war FasL kaum nachweisbar (Abb. 25). Eine densitometrische Messung der Bandenintensität der PCR-Produkte war dennoch möglich und ergab eine Erhöhung der mRNA von FasL im Myokard von Herzinsuffizienz-Patienten im Vergleich zum Spendermyokard. Dabei war die mRNA von FasL in den KHK-Patienten nur unwesentlich höher als in den Spendern. In Patienten, die an einer DCM erkrankten, zeigte sich eine deutliche Induktion der FasL-mRNA im Vergleich zu den Spendern (Abb. 26). Es bleibt allerdings offen, ob Kardiomyozyten an der Expression von FasL beteiligt waren, oder ob die FasL-mRNA ausschließlich von infiltrierenden T-Lymphozyten exprimiert wurde.

PCR-Produkt	Zyklenzahl			
GAP-DH	26			
TNF-RI	30			
TRADD	37			
FasL	38			
FADD	36			
Caspase-8	30			
FLIP-L	26			
FLIP-S	31			

Tab. 10: Aufstellung der geeigneten Zyklenzahl zur PCR-Amplifizierung cDNA aus humanem Myokard für die angegebenen Targetgene. Die angegebenen Zyklenzahlen beziehen sich auf die Menge an cDNA aus 100 ng Gesamt-RNA. Die mRNA der Adaptermoleküle TRADD und FADD, sowie die des Fas-Liganden (FasL) waren im Vergleich zu den anderen aufgelisteten Molekülen nur sehr gering im Myokard exprimiert.



Abb. 24: Ermittlung der geeigneten Zyklenzahl zur semiquantitativen Bestimmung der mRNA-Expression in der RT-PCR aus humanem Myokard am Beispiel von TRADD. (A) Derselbe PCR-Ansatz wurde in verschiedenen Zyklen amplifiziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die 352 bp große Bande ist spezifisch für TRADD. (B) Densitometrische Bestimmung der Intensität der DNA-Banden. (C) Graphische Darstellung der linearen Beziehung der Bandenintensität zur Anzahl an PCR-Zyklen. Die Plateauphase der Amplifizierung wurde hier nach 40 Zyklen noch nicht erreicht.

	Spender	insuffizient	DCM	КНК
	n =6	n = 12	n = 6	n = 6
TNF-RI	0,64 ± 0,03	0,58 ± 0,01	$0,\!58\pm0,\!02$	0,58 ± 0,01
TRADD	0,86 ± 0,05	0,86 ± 0,03	$0,83 \pm 0,04$	0,88 ± 0,03
FADD	0,65 ± 0,03	0,63 ± 0,02	$0,64 \pm 0,03$	0,62 ± 0,04
Caspase-8	$0,82 \pm 0,02$	$0,85\pm0,02$	$0,86 \pm 0,02$	0,83 ± 0,02
FLIP-L	0,69 ± 0,02	0,66 ± 0,01	$0,64 \pm 0,02$	0,68 ± 0,01
FLIP-S	$0,53 \pm 0,02$	$0,50 \pm 0,02$	$0,49 \pm 0,03$	$0,50 \pm 0,03$

Tab. 11: Ergebnisse der Quantifizierung der mRNA-Expression durch semiquantitative RT-PCR von TNF-RI und Elementen der apoptotischen Signalkaskade von TNF-RI und Fas. Die Intensität der Banden der PCR-Produkte wurde densitometrisch ermittelt und auf die Intensität der GAP-DH-Bande bezogen. Alle Werte sind in relativen Einheiten ± SEM angegeben.



Abb. 25: Nachweis und semiquantitative Bestimmung der mRNA von TNF-RI, TRADD, FasL, FADD, Caspase-8 und FLIP-L und -S in humanem linksventrikulären Myokard mittels RT-PCR. Nach RT-PCR wurden die erhaltenen PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt und densitometrisch ausgewertet. FLIP-L enthält zusätzlich ein 192 bp langes alternativ gespleißtes Exon im Vergleich zu FLIP-S. M = 100 bp-Leiter.



Abb. 26: Ergebnisse der mRNA-Quantifizierung von FasL im humanen linksventrikulärem Myokard. Die Intensität der Banden der PCR-Produkte nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurde densitometrisch ermittelt und auf die Intensität der PCR-Bande von GAP-DH bezogen. (**) p = 0,08 vs. Spender, * 0,05 > p > 0,01 vs. Spender).

4.4 Nachweis von Apoptose im humanen Myokard

4.4.1 Bestimmung des apoptotischen DNA-Leiterscores in humanen linksventrikulären Myokardproben durch Agarosegelelektrophorese von genomischer DNA

Der hier verwendete Nachweis von Apoptose beruht auf einem wichtigen biochemischen Merkmal des programmierten Zelltodes, der internukleosomalen Spaltung der Kern-DNA (Wyllie *et al.*, 1984). Dazu wurde die genomische DNA aus linksventrikulärem Myokard der Patienten isoliert und nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel auf das Vorhandensein einer typischen DNA-Leiter hin untersucht (vgl. 3.4.1). Die Analyse wurde an Proben des linksventrikulären Myokards von 9 Spenderherzen (Durchschnittsalter des 1 weiblichen und der 8 männlichen Spender 32 ± 4 Jahre) und 25 terminal insuffizienten Herzen (Durchschnittsalter der 4 weiblichen und der 21 männlichen Patienten 54 ± 2 Jahre, 10 waren an einer KHK, und 15 an einer DCM, darunter die 4 Frauen, erkrankt) durchgeführt, an denen auch bereits Genexpressionsuntersuchungen durchgeführt wurden. Die EF betrug durchschnittlich 26,7 ± 2%.

Von jedem Patienten wurden jeweils 600, 2.400 und 4.800 ng DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit dem DNA-Farbstoff SYBR™ Green angefärbt. Die Intensität der Banden der einzelnen "Leiterfragmente" wurde densitometrisch ermittelt und deren Summe in Relation zur aufgetragenen DNA-Menge berechnet (= apoptotischer DNA-Leiterscore, vgl. 3.4.1 und Abb. 7).

Wie in Abb. 27 zu sehen, zeigte sich in den humanen Myokardproben lediglich eine sehr schwache, aber dennoch erkennbare DNA-Leiter. Das macht deutlich, daß die Apoptosehäufigkeit in den untersuchten Proben insuffizienten Myokards nur sehr gering war. Für die Bestimmung des apoptotischen DNA-Leiterscores im humanen Myokard erwies sich eine Menge von 2.400 ng DNA am günstigsten. Bei 600 ng war zum Teil noch keine DNA-Leiter zu sehen, während bei 4.800 ng Überladungseffekte die Auswertung erschwerten.

Es zeigte sich ein signifikant erhöhter apoptotischer DNA-Leiterscore im insuffizienten Myokard im Vergleich zum Spendermyokard. Das sagt gleichzeitig aus, daß die zur Verfügung stehenden Spenderherzen ebenfalls nicht ganz frei von internukleosomaler DNA-Spaltung waren. Während 6 der Spender keine oder kaum eine DNA-Leiter zeigten, hatten 3 eine deutliche Leiterbildung; diese gingen aber dennoch in die statistische Auswertung mit ein. Bei der Untersuchung des insuffizienten Myokards hingegen zeigte lediglich 1 Probe keine DNA-Leiter, während die restlichen Proben eine leichte bis starke DNA-Leiter aufwiesen.

Der apoptotische DNA-Leiterscore war in den DCM-Patienten signifikant niedriger als in den KHK-Patienten. Auch Patienten mit ACE-Inhibitor-Therapie hatten ebenfalls einen erniedrigten apoptotischen DNA-Leiterscore im Vergleich zu denen ohne. Die Ergebnisse sind Abb. 28 zu-

sammengefaßt und bestätigen wie einleitend erwähnt, ein erhöhtes Auftreten von Apoptose im terminal insuffizienten Myokard (vgl. 1.3).



Abb. 27: Nachweis der apoptotischen DNA-Leiter nach gelelektrophoretischer Auftrennung der genomischen DNA aus humanem Myokard. Von einer Probe des linken Ventrikels eines Spenders bzw. eines Herzinsuffizienz-Patienten wurden jeweils 600, 2.400 und 4.800 ng DNA im Agarosegel aufgetrennt und mit dem DNA-Farbstoff SYBRTM Green angefärbt. DNA-Leiter-Fragmente, die sich in ihrer Größe um etwa 180 bp unterscheiden und somit auf apopotische Zelluntergänge im Gewebe hindeuten, sind mit weißen Pfeilspitzen markiert. M = 100 bp-Leiter.



Abb. 28: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Bestimmung des apoptotischen DNA-Leiterscores und Vergleich der unterschiedlichen Patientengruppen. Von den Patienten ohne ACE-Inhibitoren waren 5 an KHK und einer an DCM erkrankt. (*p < 0,05 vs. Spender; p < 0,05 vs. DCM; (*)0,1 > p > 0,05 vs. mit ACE-Inhibitor)

4.4.2 Abnahme des apoptotischen DNA-Leiterscores im insuffizienten linksventrikulären Myokard nach hämodynamischer Entlastung durch ein VAD

Von 7 der 10 unter 4.1.5 aufgeführten VAD-Patienten stand noch genügend Material des LV vor und nach Einbau des VAD zur Verfügung, um die genomische DNA für die Bestimmung des apoptotischen DNA-Leiterscores zu isolieren. Es wurden von jedem Patienten 2.400 ng DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und der Score wie unter 3.4.1 und Abb. 7 beschrieben bestimmt. Es zeigte sich in allen prä- und auch post-VAD-Proben eine deutliche DNA-Leiter, wie dies auch im insuffizienten Myokard beobachtet wurde (vgl. 4.4.1). Der apoptotische DNA-Leiterscore nahm in den post- im Vergleich zu den prä-VAD-Proben signifikant um durchschnittlich 31% ab (Tab. 12); war aber in den Patienten nach VAD-Entlastung immer noch deutlich höher als im Spendermyokard (Abb. 29).

Patient	Diagnose	Dauer des	Leiterscore				
		VAD (Tage)	pre	post	Δin %		
В	DCM	42	0,1021	0,0456	-55,3		
С	НСМ	57	0,0656	0,0324	-50,6		
D	DCM	64	0,0623	0,0524	-15,9		
Е	DCM	116	0,0632	0,0500	-20,8		
F	DCM	117	0,0743	0,0697	-6,2		
G	DCM	140	0,0594	0,0427	-28,2		
Н	DCM	169	0,0621	0,0362	-41,6		
Mean			0,0697	0,0470*	-31,2		
SEM			0,006	0,005	7,0		

Tab. 12: Zusammenfassung der Ergebnisse der Bestimmung des apoptotischen DNA-Leiterscores im LV von Patienten vor und nach Entlastung durch ein VAD. Die prozentuale Änderung des Wertes prä- zu post-VAD ist jeweils in der letzten Spalte der Tabelle angegeben. Alle anderen Werte sind in relativen Einheiten/2.400 ng DNA angegeben. (prä = vor VAD-Entlastung (Implantation); post = nach VAD-Entlastung (Transplantation); *p < 0,001 im gepaarten t-Test).



Abb. 29: Graphische Darstellung der Ergebnisses der Bestimmung des apoptotischen DNA-Leiterscores in den VAD-Patienten. (***p < 0,001 vs. Spender; **p < 0,01 vs. prä-VAD im gepaarten t-Test)

4.4.3 Nachweis von Apoptose im RA

Von 18 Patienten, bei denen das rechte Atrium (RA) auf die Expression der Fas-mRNA hin untersucht wurde (vgl. 4.1.1), stand auch noch Material zur DNA-Präparation und somit zur Bestimmung des apoptotischen DNA-Leiterscores zur Verfügung; 3 Patienten der NYHA 1-Gruppe und 15 Patienten der NYHA 3,5 - 4-Gruppe.

Insgesamt gesehen war die Apoptosehäufigkeit gemessen am DNA-Leiterscore im RA ebenfalls wie im LV sehr gering. Das Bild gestaltete sich insgesamt recht heterogen. Von 18 untersuchten Proben zeigten 3 eine sehr starke DNA-Leiter, wobei ein Patient davon zur NYHA 1-Gruppe gehörte. Die restlichen Patienten zeigten keine oder nur eine geringe DNA-Leiter (Ergebnis nicht dargestellt). Der durchschnittliche Wert für alle Patienten lag bei $0,0219 \pm 0,01$ relativen Einheiten/2.400 ng DNA. Zwischen den einzelnen Patientengruppen und deren Medikamentation mit ACE-Inhibitoren konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 13 zusammengefaßt.

NYHA 1	NYHA 3,5 - 4	mit ACE-I.	ohne ACE-I.
n = 3	n = 15	n =7	n = 8
$0,0458 \pm 0,0409$	$0,0171 \pm 0,0081$	0,0289 ± 0,0165	$0,0069 \pm 0,004$

Tab. 13: Ergebnis der Bestimmung des apoptotischen DNA-Leiterscores im RA. Alle Werte sind in relativen Einheiten/2.400 ng \pm SEM angegeben. Es wurde lediglich die NYHA 3,5 - 4-Gruppe nach Medikamentation mit und ohne ACE-Inhibitoren unterschieden.

4.4.4 Nachweis apoptotischer Zellen auf Gewebeschnitten von humanem Myokard mittels TUNEL-Methode

Apoptose kann *in situ* ebenfalls durch den Nachweis des internukleosomalen DNA-Abbaus detektiert werden. Dabei wird die gespaltene DNA enzymatisch markiert und kann dann immunhistochemisch sichtbar gemacht werden (Gavrieli *et al.*, 1992).

Von 15 Patienten (10 insuffiziente und 5 normale) konnten Gefrierschnitte des LV angefertigt und das Gewebe auf das Vorkommen apoptotischer Zellen hin untersucht werden. Es konnten vereinzelt braune Kerne, aufgrund der Farbreaktion der Antikörper gekoppelten Peroxidase, in den Gewebeschnitten nachgewiesen werden (Abb. 30). Von etwa 3.000 ausgezählten Zellen, hatten durchschnittlich 0 - 3 Zellen einen "apoptotischen" Kern, also 0 bis 0,1% der Zellen im Gewebe des insuffizienten Myokards.

Auf eine genauere Auszählung wurde bewußt verzichtet, da die Spezifität der Methode umstritten ist (Frankfurt *et al.*, 1996). Zudem erschwerten sekundäre Effekte der Gefrierschnitte die Auswertung. Die Struktur des Gewebes bleibt in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Proben besser erhalten; sie wären zu diesem Zwecke vorteilhafter als Gefrierschnitte gewesen. Solche Proben der untersuchten Patienten standen jedoch nicht zur Verfügung.

Daher wurde größerer Wert auf die Auswertung des apoptotischen DNA-Leiterscores gelegt. Die präparierte DNA präsentierte zudem mehr Zellen als beispielsweise ein Schnitt. Der Score ist durch die Verwendung von SYBR[™] Green zum Anfärben der DNA ebenfalls sehr sensitiv. Der Nachweis der DNA-Leiter zeigte sich eindeutiger in der Aussage als die Braunfärbung auf den Gewebeschnitten. Der Nachteil des Scores liegt allerdings in der fehlenden Zelltypisierung.



Abb. 30: Nachweis apoptotischer Kardiomyozytenkerne in humanem Myokard durch TUNEL-Färbung an Gefrierschnitten. In (A) und (B) ist jeweils ein TUNEL-positiver Kern mit einem Pfeil markiert. Umliegende blaue Kerne sind nicht apoptotisch.

4.4.5 Vergleich der Apoptosehäufigkeit von isolierten Kardiomyozyten der Ratte in Kultur mit der im Gewebe

Von einer unbehandelten 2 Tage alten Kultur neonataler Rattenkardiomyozyten in Normalmedium und vom LV einer normalen WKY-Ratte wurde die DNA präpariert und in verschiedenen Konzentrationen parallel gelelektrophoretisch aufgetrennt und der apoptotische DNA-Leiterscore ermittelt.

Die isolierten Kardiomyozyten in Kultur zeigten bereits ab 500 ng aufgetragener DNA eine deutliche DNA-Fragmentierung, während im Gewebe erst bei 3.000 ng DNA eine sehr leichte und deutlich schwächere DNA-Leiter zu sehen war (Abb. 31). Die Ermittlung des apoptotischen DNA-Leiterscores ergab einen um etwa das 5 bis 10fach höheren Wert bei den neonatalen Kardiomyozyten im Vergleich zum linksventrikulären Gewebe. Bereits bei der Auftragung von 3.000 ng DNA zeigten sich bei den neonatalen Kardiomyozyten deutliche Überladungseffekte, welche die Auswertung erschwerten und sich in einem abnehmenden Score bei zunehmender DNA-Menge verdeutlichten. Die einzelnen Werte sind in Tab. 14 dargestellt.

Isolierte Kardiomyozyten in Kultur wiesen deutlich mehr Apoptose auf als Kardiomyozyten im Gewebeverband des normalen linken Ventrikels.



Abb. 31: Gelbild zum Nachweis von apoptotischer DNA-Fragmentierung in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte in Kultur und im Gewebe des LV. Jeweils 500 bis 5.000 ng der DNA wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit SYBRTM Green angefärbt. Neonatale Kardiomyozyten zeigen eine deutlich erkennbare apoptotische DNA-Leiter. M = 100 bp-Leiter.

	neonatale Rattenkardiomyozyten					linksventrikuläres Gewebe								
ng DNA	500	1.000	1.500	2.000	3.000	4.000	5.000	500	1.000	1.500	2.000	3.000	4.000	5.000
Score	0,432	0,416	0,322	0,264	0,300	0,212	0,233	0,000	0,043	0,029	0,047	0,044	0,040	0,046

Tab. 14: Apoptotischer DNA-Leiterscore von Kardiomyozyten in Kultur und im Gewebe. Der Score ist jeweils in relativen Einheiten pro aufgetragener Menge DNA angegeben.

4.5 Untersuchungen zur Apoptose im System der Langzeitkultur von rechtsventrikulären Kaninchentrabekeln

Eine Alternative zu Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten bietet die Kultivierung multizellulärer Muskelpräparate (*ex vivo*-Herzmuskel-Kultursystem), wie sie in Abb. 3 dargestellt ist. Diese Methode ermöglicht eine Beobachtung der Zellen in ihrem ursprünglichen Gewebeverband. Durch eine Zusammenarbeit mit der Georg-August-Universität Göttingen stand Material für Untersuchungen zur Apoptose in diesem System zur Verfügung.

In ersten Versuchen der Göttinger Arbeitsgruppe konnten Trabekel des rechten Ventrikels von normalen weiblichen New Zeeland White Star-Kaninchen über 48 h bei 37 °C in einem modifizierten Zellkulturmedium kultiviert werden. Dabei blieben muskelphysiologische Parameter der Trabekel über den Kultivierungszeitraum stabil (Janssen *et al.*, 1998).

4.5.1 Muskelphysiologische Parameter der Trabekel über 48h

Die leicht gedehnten Trabekel (Zustand 2, vgl. 2.3) zeigten zu Beginn des Versuches eine aktiv entwickelte Kraft (F_{dev}) von 1,4 ± 0,3 mN/mm² (n = 16), die über den Kultivierungszeitraum konstant blieb und nach 48 h 1,3 ± 0,4 mN/mm² betrug. Eine diastolische Kraft war in diesem Zustand nicht meßbar. Die gedehnten Trabekel (Zustand 3, vgl. 2.3) hatten eine anfängliche F_{dev} von 9,1 ± 1,2 mN/mm² (n = 20), die aufgrund des Frank Starling Mechanismus wesentlich höher war im Vergleich zu den leicht gedehnten Trabekeln. F_{dev} stieg über 8 - 10 h an und erreichte nach etwa 25 h ein Maximum von 29,6 ± 2,9 mN/mm². Danach sank F_{dev} wieder ab und erreichte mit 10,2 ± 1,5 mN/mm² nach 48 h in etwa wieder den Ausgangswert (Abb. 32 A). Die diastolische Kraft (F_{dia}) war über den gesamten Zeitraum in den gedehnten Muskeln unverändert (Abb. 32 A). Die Trabekel kontrahierten am Ende des Kultivierungszeitraumes deutlich langsamer als zu Beginn des Versuches; dies zeigte sich in einem Anstieg der Zeit bis zur maximalen Spannungsentwicklung (time to peak = TTP) und der Zeit bis zur 50%igen Relaxation (RT_{50%}) über 48 h (Abb. 32 B).



Abb. 32: Muskelphysiologische Parameter der auf L_{max} gedehnten Trabekel über einen Kultivierungszeitraum von 48 h. (A) Zeitverlauf der aktiv entwickelten Kraft (F_{dev} oben in blau) und der diastolischen Kraft (F_{dia} unten in rot). (B) Zeitverlauf der jeweiligen Zeiten bis zur maximalen Kontraktion (TTP oben in blau) und bis zur 50% igen Relaxation ($RT_{50\%}$ unten in rot). Es sind jeweils Mittelwerte ± SEM angegeben.

4.5.2 Apoptose in isolierten, gedehnten Trabekeln in Kultur über 48 h

Zur Bestimmung der Apoptosehäufigkeit in den rechtsventrikulären, kultivierten Kaninchentrabekeln wurden nach verschiedenen Zeitpunkten (t = 0, 2, 6, 24 und 48 h) die Proben aus der Apparatur entnommen, die DNA präpariert und der apoptotische DNA-Leiterscore bestimmt (vgl.
3.4.1). Die Proben einer Versuchsreihe stammten jeweils vom selben Kaninchen und konnten parallel kultiviert werden. Die Trabekel wurden dabei für den gesamten Kulturzeitraum auf L_{max} gedehnt (Zustand 3, vgl. 2.3).

Für die Bestimmung des apoptotischen DNA-Leiterscores erwies sich die Auftrennung von 400 ng DNA als optimal, bei größeren Mengen erschwerten Überladungseffekte die Auswertung. Zudem ließ die Größe der Proben kaum wesentlich höhere Ausbeuten zu.

Die Kontrolltrabekel zeigten keinerlei Anzeichen einer DNA-Leiter, auch nach 2 und 6 h Dehnung in der Apparatur war keine apoptotische DNA-Fragmentierung sichtbar; auch nicht in den Blöcken (Endstücke der Trabekel, die der Befestigung dienten). Nach 24 h Dehnung stieg die Apoptosehäufigkeit deutlich an und blieb innerhalb weiterer 24 h konstant. Die Unterteilung in Muskel und Blöcke (vgl. 2.3) erwies sich als sinnvoll, da die Blöcke eine deutliche Tendenz zu mehr Apoptose im Vergleich zu den Muskeln zeigten (Abb. 33).



Abb. 33: Nachweis der apoptotischen DNA-Fragmentierung in auf L_{max} gedehnten Trabekeln über einen Zeitraum von 48 h. Die Färbung der genomischen DNA (400 ng) nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte mit SYBRTM Green. Die Kontrollen und die Proben nach einer Kulturdauer bis zu 6 h waren frei von DNA-Leitern. Nach 24 h Inkubation zeigte sich deutlich eine DNA-Leiter im Muskel (M), die über weitere 24 h unverändert blieb. Die Blöcke (B) zeigten eine stärkere apoptotische DNA-Leiter im Vergleich zu den Muskeln bei Auftragung gleicher Mengen DNA. m = 100 bp-Leiter.

Auf Paraffinschnitten einzelner Trabekel konnte durch TUNEL-Färbung der Zeitverlauf des Einsetzens apoptotischer Kernveränderungen in den Kardiomyozyten bestätigt werden (Abb. 34). In den Kontrolltrabekeln wurden vereinzelt im Randbereich braune Kerne gefunden, die möglicherweise eine unspezifische Reaktion darstellten, oder auf Präparationsartefakte im Randbereich (Druck mit Pinzette) zurückzuführen sind (Ergebnis nicht dargestellt). Nach 2 und 6 h Inkubation konnten nur selten und vereinzelt im Randbereich braune Kerne nachgewiesen werden (Abb. 34 C). Nach 24 h Dehnung in der Muskelkammer konnten deutlich positive Kerne von Kardiomyozyten im gesamten Präparat beobachtet werden (Abb. 34 F), jedoch bevorzugt in den Randbereichen des Trabekels. Auch nach 48 h zeigte sich ein ähnliches Bild (Abb. 34 G-H). Für jede Probe wurden eine Negativ- und Positivkontrolle (vgl. 3.4.2.3) mitgeführt (Abb. 34 A, B und D, E). Die Zahl apoptotischer Kardiomyozytenkerne nach 24 bzw. 48 h kann auf etwa 1/4 bis 1/3 der Gesamtzellen auf dem Schnitt abgeschätzt werden. TUNEL-positive Kardiomyozyten zeigten jedoch keine lichtmikroskopisch erkennbaren, morphologischen Veränderungen (Abb. 34 G-H). Innerhalb von 6 bis 24 h führte die chronische Überlast eines Herzmuskelpräparates in der Muskelkammer zu deutlichen Zeichen des internukleosomalen, apoptotischen DNA-Abbaus, dessen Stärke sich jedoch über weitere 24 h nicht änderte.

(Abbildung auf der folgenden Seite)

Abb. 34: Nachweis apoptotischer DNA-Veränderungen auf Gewebeschnitten in den Kardiomyozyten gedehnter Trabekel (L_{max}) durch die TUNEL-Methode. (A) und (D) zeigen jeweils Negativkontrollen (ohne TdT), in der alle Kerne blau sind (Gegenfärbung mit Haemalaun) und (B) und (E) zugehörige Positivkontrollen der Färbung, bei der fast alle Kerne nach DNase-Verdau durch TUNEL markiert sind (braun durch Farbreaktion der Peroxidase). Nach 2 h Dehnung waren kaum markierte Kerne im Trabekel zu finden (C), während nach 24 h zahlreiche Kerne die charakteristische Braunfärbung zeigten (F). In (G) und (H) sind jeweils typische TUNEL-positive Zellkerne (nach 48 h Dehnung) mit einem Pfeil markiert.



Abbildung 34

4.5.3 Variable Dehnung und Apoptose in den kultivierten Trabekeln

Zur Überprüfung der Abhängigkeit des Ausmaßes der Apoptose von der Stärke der chronischen Überlast des Muskels wurden verschiedene Dehnungszustände (vgl. 2.3) über 48 h betrachtet. Die Trabekel wurden wiederum nach dem Versuch in Blöcke und Muskel unterteilt.

Es zeigte sich eindeutig, daß die Apoptosehäufigkeit, gemessen am apoptotischen DNA-Leiterscore (Abb. 35), der auf L_{max} gedehnten Muskeln (Zustand 3, vgl. 2.3) durchschnittlich um das 2- bis 3fache signifikant erhöht war im Vergleich zu den ungedehnten Muskeln (Zustand 1, vgl. 2.3). Es wurden dabei ungedehnte Trabekel mit kaum nachweisbarer, aber auch mit deutlich erkennbarer apoptotischer DNA-Leiter beobachtet. Eine geringe Belastung des Muskels (Zustand 2, vgl. 2.3) führte ebenfalls zu einer im Vergleich zu den ohne Last kontrahierenden Muskeln zu einer erhöhten Apoptosehäufigkeit, die jedoch durchschnittlich niedriger war als in den auf L_{max} gedehnten Muskeln. Die Ergebnisse sind in Abb. 36 zusammengefaßt. Kontrolltrabekel zeigten keine apoptotische DNA-Leiter, die Blöcke der gedehnten Trabekel zeigten eine stärkere DNA-Leiter als die Blöcke der ungedehnten Trabekel (Abb. 35).

In einem zusätzlichen Versuch wurden ungedehnte Trabekel mit Hydroxylradikalen (Janssen *et al.*, 1999) behandelt. Dies führte ebenfalls zu einer deutlich erhöhten Apoptosehäufigkeit (Abb. 35). Hingegen zeigten Hydroxylradikale keine zusätzlichen Auswirkungen auf die Apoptose gedehnter Trabekel (Ergebnis nicht dargestellt).

Die Kultivierung von Trabekeln ohne Last über einen Zeitraum von 48 h führte zu einer sichtbaren apoptotischen DNA-Fragmentierung im Gesamtpräparat. Dehnung unterschiedlicher Stärke sowie die Gabe von Radikalen im Kulturmedium induzierte deutlich eine zusätzliche Apoptose im Muskelpräparat.



Abb. 35: Nachweis von apoptotischen DNA-Leitern in unterschiedlich stark gedehnten Trabekeln nach 48 h Kulturdauer. *A.* ungedehnter; *B.* leicht gedehnter; *C.* auf L_{max} gedehnter Trabekel; *D.* ungedehnter Trabekel nach Applikation von Hydroxylradikalen. M: Muskel; B: Blöcke K: Kontrolle; m = 100 bp-Leiter.



Abb. 36: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Bestimmung des apoptotischen DNA-Leiterscores in rechtsventrikulären Trabekeln unter verschiedenen Dehnungszuständen. Die Kontrolltrabekel zeigten keinerlei DNA-Leiter. (*p < 0.05 vs. ungedehnt).

4.5.4 Verminderte mRNA-Expression von bcl-x_L in den Kaninchentrabekeln nach Dehnung

In den über 48 h kultivierten Trabekeln sollte zunächst die mRNA des ANP (atriales natiuretisches Peptid) als ein Marker für Überlast oder Überdehnung des Myokards (Knowlton, 1992), die des Apoptose auslösende Fas-Rezeptors und des antiapoptotischen Mitgliedes der Bcl-2-Familie bcl- x_L , das bei Herzinsuffizienz herabreguliert ist (Bartling *et al.*, 1999), untersucht werden.

Aufgrund der Größe der Kaninchentrabekel (vgl. 2.3) stand für die Untersuchungen zur mRNA-Expression nur sehr wenig Material zur Verfügung, so daß keine Standard kalibrierte, kompetitive RT-PCR angewendet werden konnte. Daher sollte die Quantifizierung in einer semiquantitativen RT-PCR unter Normalisierung auf GAP-DH erfolgen. Die Sequenzen der GAP-DH und des ANP von Kaninchen waren aus der Datenbank bekannt, und es konnten spezifische Primer bestimmt werden, bzw. die der humanen GAP-DH verwendet werden (Tab. 1). Die Spezifität konnte durch Sequenzierung der PCR-Fragmente bestätigt werden.

Die Sequenzen für Fas und bcl- x_L waren vom Kaninchen nicht bekannt. Daher wurden die vorhandenen humanen Primer auf ihre Spezifität für Kaninchen getestet (vgl. Tab. 1). Aus cDNA des LV eines normalen Tieres konnte jeweils für Fas und bcl- x_L ein Fragment amplifiziert werden, daß der Größe des entsprechenden humanen Fragmentes genau entsprach (Abb. 37). Durch Sequenzierung konnten die DNA-Fragmente genauer analysiert werden. Das vermeintliche ca. 550 bp große "Kaninchenfragment" für bcl- x_L zeigte über 90% Homologie und das ca. 500 bp große Kaninchen-Fragment für Fas über 80% Homologie im sequenzierten Bereich zur entsprechenden humanen Sequenz. Beide konnten somit als spezifisches Kaninchenbel- x_L und -Fas bestätigt werden. Für Fas wurden wegen der geringeren Homologie zusätzlich aus dem sequenzierten Bereich spezifische Primer abgeleitet, die ein ca. 350 bp großes Fragment ergaben (Tab. 1).

Auch hier war es wiederum wichtig, die optimale Zyklenzahl jedes einzelnen PCR-Produktes zu bestimmen, um nicht die Plateauphase der PCR-Amplifizierung zu erreichen. Die getesteten Zyklenzahlen sind in Tab. 15 zusammengefaßt.

PCR-Produkt	Zyklenzahl
GAP-DH	25
ANP	36
bcl-x _L	32
Fas	35

Tab. 15: Anzahl der Zyklen zur quantitativen PCR-Amplifizierung aus Kaninchenmyokard. Die Zyklenzahlen beziehen sich auf 1/5 der cDNA aus Gesamt-RNA des Trabekels (Muskel ohne Blöcke).



Abb. 37: Amplifizierung spezifischer PCR-Fragmente aus cDNA aus Kaninchenmyokard mit humanen Primern. Mit Hilfe der spezifischen humanen Primer für bcl- x_L und Fas (Fas S2 und AS) wurde jeweils ein Fragment derselben Größe aus Kaninchen-cDNA und humaner cDNA (jeweils Myokard) amplifiziert. Im Kaninchen konnten wiederum keine löslichen Isoformen von Fas detektiert werden, die Bande für humanes FasExo6Del ist durch einen weißen Pfeil markiert. h = human; r = rabbit; M = Marker. Zur Analyse der Expression der mRNA in den Kaninchentrabekeln wurden die Dehnungszustände mit den größten Differenzen in der Apoptosehäufigkeit gewählt: ungedehnt (n = 4) und auf L_{max} gedehnt (n = 5) (Zustand 1 und 3, vgl. 2.3). Die Kultivierung bzw. Dehnung erfolgte in allen Proben über 48 h, die Trabekel wurden wiederum in Muskel und Blöcke unterteilt, wobei die Blöcke verworfen wurden. Als Kontrollen (n = 6) dienten Trabekel, die sofort nach der Präparation eingefroren wurden.

In allen Proben konnte die mRNA für ANP, Fas und bcl- x_L mittels RT-PCR detektiert werden. ANP, der als Marker für Dehnung des Myokards ausgewählt wurde, war unverändert in den ungedehnten und gedehnten Muskeln im Vergleich zu den Kontrolltrabekeln (Abb. 38 A). Nur zwei der Kontrolltrabekel zeigten eine sehr schwache ANP-Expression, während die übrigen eine ebenso starke Expression wie die Proben nach Dehnung zeigten (Ergebnis nicht dargestellt). Auch die mRNA des Apoptose auslösenden Fas-Rezeptors zeigte keinerlei Veränderungen in den einzelnen Proben (Abb. 38 B). Hingegen war die mRNA des antiapoptotischen bcl- x_L in den auf L_{max} gedehnten Trabekeln signifikant auf die Hälfte im Vergleich zu den Kontrolltrabekeln reduziert (Abb. 38 C). In den ungedehnten Trabekeln verringerte sich die Expression von bcl- x_L geringfügig.

Die Analyse von ANP eignet sich in diesem System nicht als Marker für Dehnung, möglicherweise bedingen präparative Einflüsse dieses Ergebnis. Die verringerte Expression von $bcl-x_L$ steht möglicherweise im Zusammenhang mit einer erhöhten Apoptosehäufigkeit in den Trabekeln nach Dehnung, während die Expression von Fas unverändert bleibt.



Abb. 38: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Quantifizierung der mRNA-Expression von ANP (A), Fas (B) und bcl- x_L (C) durch semiquantitative RT-PCR in Kaninchentrabekeln unter verschiedenen Dehnungszuständen. K = Kontrolltrabekel; gedehnt = auf L_{max} gedehnt. (**p < 0,005 vs. K)

5 DISKUSSION

Bisher galten Herzmuskelzellen, wie auch Nervenzellen, als terminal differenzierte Zellen, welche ihre Funktionen über das gesamte Leben des Organismus erfüllen. Seit der Beobachtung einzelner mitotischer Zellstadien im insuffizienten Myokard wird dieses Dogma in Frage gestellt (Liu *et al.*, 1995; Quiani *et al.*, 1994). Dennoch ist unumstritten, daß Herzmuskelzellen nur eine extrem geringe Kapazität zur Proliferation besitzen und es ist leicht vorstellbar, daß ihr Verlust durch Nekrose oder Apoptose nach einem Herzinfarkt oder im Endstadium der Herzinsuffizienz folgenschwere Veränderungen für die Funktion des gesamten Myokards und damit für das Herz-Kreislaufsystem mit sich bringt. Es ist deshalb von Bedeutung, molekulare Veränderungen und Mechanismen aufzuklären und zu verstehen, die zu Apoptose im Myokard führen.

Daher lag ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit darin, mit Hilfe von Expressionsanalysen insuffizientes humanes Myokard, in dem Apoptose nachgewiesen werden kann, gezielt nach Veränderungen zu untersuchen, die auf einen veränderten Phänotyp hindeuten, der für den programmierten Zelltod anfälliger ist.

Am Modellsystem der isolierten Kaninchentrabekel, in dem Kardiomyozyten in ihrem ursprünglichen Gewebeverband erhalten sind, sollte *in vitro* überprüft werden, ob chronische Überlast (Dehnung in einem physiologisch relevanten Bereich) zu vermehrter Apoptose führt.

5.1 Untersuchungen im humanen insuffizienten Myokard

5.1.1 Nachweis von Apoptose in den Myokardproben

In einer Reihe von Untersuchungen konnte der Verlust von Kardiomyozyten durch Apoptose im Endstadium der Herzinsuffizienz des Menschen eindeutig beobachtet werden (Narula *et al.*, 1996; Olivetti *et al.*, 1997; Saraste *et al.*, 1999; Guerra *et al.*, 1999). Diese Befunde basieren auf dem Nachweis nukleärer, für Apoptose typischer Veränderungen der Kardiomyozytenkerne durch TUNEL oder den *Taq* Polymerase Assay auf Gewebeschnitten. Bei den genannten Nachweismethoden wird die im Verlauf der Apoptose durch aktivierte Endonukleasen gespaltene DNA am 3'OH-Ende enzymatisch markiert und immunhistochemisch dargestellt (Didenko und Hornsby, 1996; Gavrieli *et al.*, 1992). Die Angaben zur genauen Anzahl apoptotischer Kardiomyozytenkerne im nichtischämischen insuffizienten Myokard sind recht variabel. Voneinander unabhängige Arbeitsgruppen bestätigten einen Anteil von etwa 0,2% (Olivetti *et al.*, 1997; Saraste *et al.*, 1999); Guerra *et al.*, 1999), während ein Wert von 35,5% mit Sicherheit einen Kalku-

lationsfehler beinhaltet (Narula et al., 1996). Es wurden auch Daten von lediglich 0,01% mitgeteilt (Schaper et al., 1999). Der Nachweis nukleärer DNA-Veränderungen der Zellkerne durch die TUNEL-Methode wird allgemein zur Detektion apoptotischer Zellen genutzt, obwohl es immer wieder Diskussionen über die Spezifität (Apoptose oder Nekrose) und zur Interpretation der Methode gibt (Frankfurt et al., 1996; Freude et al., 1998; Schaper et al., 1999; Darmer et al., 2000). Eine neuere Studie behauptet, daß TUNEL-positive Kardiomyozyten lediglich eine erhöhte Aktivität von DNA-Reparaturmechanismen aufweisen (Kanoh et al., 1999). Es sind daher zusätzliche Kriterien, wie zum Beispiel der Nachweis typischer morphologischer Veränderungen der Zelle, zur Bestimmung des Zelltodes notwendig. Auch die Dokumentation der apoptotischen DNA-Leiter, die durch den internukleosomalen DNA-Abbau entsteht, nach gelelektrophoretischer Auftrennung, gilt als sicheres Indiz für Apoptose (Arends et al., 1990; Bursch et al., 1990). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zur Abschätzung des Anteils apoptotischer Kardiozyten ein DNA-Leiterscore entwickelt, der die Quantifizierung von Apoptose in Geweben oder Zellkulturen erlaubt. Dieser apoptotische DNA-Leiterscore errechnet sich aus der Intensität der apoptotischen DNA-Leiterbanden zu der Menge an DNA, die elektrophoretisch aufgetrennt wurde. Diese Methode erwies sich als reproduzierbar für die untersuchten Proben. Durch die Verwendung von SYBR[™] Green, einem im Vergleich zu Ethidiumbromid deutlich sensitiveren DNA-Farbstoff, war die Methode zudem auch sehr empfindlich. Da im insuffizienten Myokard nur eine sehr geringe Anzahl apoptotischer Zellen erwartet wurde, war dies von besonderer Bedeutung. Für den Nachweis einer apoptotischen DNA-Fragmentierung im humanen Myokard mußten etwa 2-3 µg DNA aufgetrennt werden (vgl. Abb. 27).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte Apoptosehäufigkeit in den untersuchten Proben insuffizienten, linksventrikulären humanen Myokards dokumentiert werden, die im Vergleich zu den Spendern deutlich erhöht war (vgl. Abb. 28). Dieses Ergebnis steht also im Einklang mit eingangs erwähnten Studien. Dabei wurden terminal insuffiziente Patienten mit hoher und niedriger Apoptosehäufigkeit beobachtet. Solche Schwankungen wurden auch in der genannten Literatur beschrieben und geben eine plausible Erklärung für einen kausalen Zusammenhang zwischen dem variablen Auftreten der Apoptose von Kardiomyozyten und dem Verlauf bzw. dem Fortschreiten der Krankheit (Guerra *et al.*, 1999; Saraste *et al.*, 1999).

Patienten, die an einer Koronaren Herzkrankheit (KHK) erkrankt waren, hatten einen deutlich höheren apoptotischen DNA-Leiterscore als Patienten mit einer Dilatativen Kardiomyopathie (DCM, vgl. Abb. 28). Möglicherweise führen bei einer KHK eine Mangelversorgung und damit verbundener erhöhter oxidativer Streß in den Zellen neben der mechanischen Belastung zu vermehrter Apoptose.

Durch Gabe von Inhibitoren des Angiotensin konvertierenden Enzyms (ACE-Inhibitoren), eine weltweit anerkannte pharmakologische Therapie bei Herzinsuffizienz, war der apoptotische DNA-Leiterscore signifikant niedriger im Vergleich zu Patienten ohne diese Therapie (vgl. Abb. 28). Wie bereits in der Einleitung (vgl. 1.1) erwähnt, kommt es bei der Entstehung der Herzinsuffizienz zur einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems. ACE-Inhibitoren hemmen die Bildung von Angiotensin II (AngII) durch Blockierung des Angiotensin konvertierenden Enzyms. In großen Studien konnte eindeutig die protektive Wirkung der ACE-Inhibitoren bewiesen werden (The Consensus Trial Study Group, 1987; The SOLVD Investigators, 1991; Yusuf *et al.*, 1992). AngII wurde auch in Zusammenhang mit Apoptose von Kardiomyozyten gebracht: in adulten Rattenkardiomyozyten in Kultur induziert AngII Apoptose (Kajstura *et al.*, 1997) und mechanischer Streß führt im selben Modell zur Freisetzung von AngII, einhergehend mit veränderter Expression Apoptose relevanter Gene und vermehrter Apoptose, die durch Blockierung des AT1-Rezeptors, eines Rezeptors für AngII, deutlich gesenkt wurde (Leri *et al.*, 1998). Möglicherweise bewirkt ein therapeutischer Eingriff in den Signalweg des Angiotensin einen Schutz der Kardiomyozyten vor Apoptose.

Auch 3 der 6 untersuchten Spendermyokardien zeigten eine apoptotische DNA-Leiter (daher kein apoptotischer DNA-Leiterscore von 0 in den Spendern, vgl. Abb. 28). Die Schwierigkeit bei solchen Studien besteht stets in der Verfügbarkeit wirklich gesunder Kontrollherzen. Die Spenderherzen, die für die Analysen in der vorliegenden Arbeit zur Verfügung standen, wurden wie eingangs erwähnt aus technischen Gründen nicht transplantiert. Mit Sicherheit hatten diese Spender keine Beschwerden, wegen derer sie in kardiologischer Behandlung vor ihrem Tod waren. Andererseits ist jedoch unklar, welche Schädigungen das Herz während des Verbleibens des Patienten auf der Intensivstation bis zur Feststellung des Hirntodes und Entnahme der Organe genommen hat.

Im rechten Atrium (RA) konnten keine wesentlichen Unterschiede im apoptotischen DNA-Leiterscore zwischen Patienten mit Herzinsuffizienz der Schweregrade NYHA 1 und NYHA 3,5 bis 4 festgestellt werden (vgl. Tab. 13). Ein möglicher Grund könnte darin liegen, daß sich eine Insuffizienz des linken Ventrikels bei heute üblicher Diuretikatherapie nicht als derart massive Stauung bis in das rechte Herzohr auswirkt, so daß dort Dehnungs-induzierte Kernapoptose (DNA-Leiter) meßbar wird.

Der apoptotische DNA-Leiterscore eignet sich zum Nachweis und zur Quantifizierung von Apoptose, läßt jedoch die Frage nach dem von der Apoptose betroffenen Zelltyp offen. Daher wurden auch für einige Proben eine TUNEL-Färbung an Gewebeschnitten des Myokards durchgeführt. Es konnten äußerst selten einzelne positive Kerne, überwiegend Kardiomyozyten, gefunden werden (Abb. 30). Auf eine exakte Auszählung dieser positiven Kerne wurde aber verzichtet, da die Spezifität und Reproduzierbarkeit der Methode, wie eingangs erwähnt, recht umstritten ist.

Aufgrund der aus der Literatur bekannten Apoptosehäufigkeit von etwa 0,2% im insuffizienten Myokard, könnte dies einem durchschnittlichen apoptotischen DNA-Leiterscore von $\approx 0,04$ relativen Einheiten/2.400 ng DNA gleichsetzt werden. Die Bestimmung der Apoptosehäufigkeit durch TUNEL oder den apoptotischen DNA-Leiterscore gibt aber nur ein Bild über die aktuelle Situation im Myokard. Unbekannt bleibt, wieviel Zellen bereits apoptotisch untergegangen sind und wieviel noch sterben werden. Zudem ist nichts über die Dauer der Apoptose von Kardiomyozyten im Gewebe bekannt. Selbst eine konstante Apoptoserate von 0,2% bei einer angenommenen Dauer des Prozesses von 24 h würde recht schnell zum Verlust einer hohen Anzahl Zellen führen und damit zur Auflösung des Organs bei einem steten Mißverhältnis zwischen Apoptose und Proliferation von Kardiomyozyten bei der Herzinsuffizienz (Kajstura et al., 1998). Aus quantitativer Beschreibung apoptotischer Kernveränderungen im Myokard ist der Beweis für eine kausale Relevanz der Apoptose für das Fortschreiten der Herzinsuffizienz jedoch nicht zu führen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit einerseits ein Modell gesucht, in dem in einem klinisch relevanten Ausmaß Überlast abhängige Apoptose im Myokard nachweisbar ist, um später mittels Gentransfer diese Apoptose zu unterdrücken und dadurch ihre pathologische Relevanz zu beweisen. Andererseits wurde gezielt nach Phänotypveränderungen Apoptose relevanter Gene im insuffizienten Myokard gesucht, die eine erhöhte Anfälligkeit der Zellen für Apoptose erklären könnten.

5.1.2 Wie verändert sich die Expression des Apoptose auslösenden Fas-Rezeptors bei der Herzinsuffizienz?

Der Apoptose auslösende Fas-Rezeptor wird konstitutiv im Myokard exprimiert (Nagata und Goldstein, 1995). Daher liegt die Vermutung nahe, daß Fas an der Auslösung von Apoptose in Kardiomyozyten beteiligt ist und eine veränderte Expression bei Herzinsuffizienz die Anfälligkeit der Zellen gegenüber Apoptose regulieren könnte. Zur Klärung dieser Frage wurde zunächst die mRNA-Expression von Fas im rechten Atrium (RA, Herzohr) mittels Standard kalibrierter, kompetitiver RT-PCR quantifiziert.

Es konnte eine 2- bis 3fach erhöhte Expression von Fas in den Patienten mit NYHA 3,5 bis 4 im Vergleich zu Patienten mit einem geringeren Schweregrad der Herzinsuffizienz bei NYHA 1 festgestellt werden. Patienten mit NYHA 2 zeigten bereits eine deutlich erhöhte Expression (vgl. 4.1.1). Im dünnwandigen RA spielt eine erhöhte mechanische Belastung, beispielsweise durch mäßig erhöhten Füllungsdruck, eine bedeutende Rolle. Eine Dehnungs-induzierte Erhöhung des myokardialen Fas-Proteins konnte experimentell zunächst in Papillarmuskeln der Ratte gezeigt werden (Cheng *et al.*, 1995), die aber später widerrufen wurde. Die hier beobachtete Erhöhung der Fas-mRNA-Expression im RA von Herzinsuffizienzpatienten kann trotzdem als Dehnungs-induziert vermutet werden, auch wenn von diesen Patienten keine Daten zu Rechtsherzfüllungs-drucken vorlagen. Interessant ist, daß in diesen rechten Vorhofproben ja noch keine erhöhte Kernapoptose nachweisbar war (vgl. 4.4.3). Im Vorhof erfolgt die Induktion von Fas anscheinend durch geringe Dehnung, die zur vollen Aktivierung der Apoptose noch nicht ausreicht.

Den funktionell bedeutenderen Teil des Herzens stellt allerdings der linke Ventrikel (LV) dar, der durch seine Muskelkraft das Blut gegen den peripheren Gefäßwiderstand in den Körper pumpt. Nach Beginn des Halleschen Transplantationsprogrammes standen auch genügend linksventrikuläre Proben terminal insuffizienten Myokards zur Verfügung. Erste Untersuchungen zeigten, daß im LV zusätzlich verkürzte Formen des Fas-Transkriptes mittels RT-PCR detektiert werden konnten, die im RA nicht nachweisbar waren (vgl. Abb. 11 und Abb. 13). Dieses Ergebnis spricht zunächst für eine herzkammerspezifische Regulation der Expression von Fas und seinen Isoformen.

Die mRNA des Fas-Rezeptors zeigte nur eine leichte Tendenz zur erhöhten Expression im terminal insuffizienten Myokard, während die lösliche, antagonistische Form FasExo6Del im insuffizienten Myokard im Vergleich zum Spendermyokard signifikant herabreguliert war (vgl. Abb. 14). Auch 4 weitere Isoformen: FasExo3,4,6Del, FasExo4Del, FasExo4,6Del und FasExo3,4Del, die im Spendermyokard sehr schwach exprimiert waren, konnten im insuffizienten Myokard nicht detektiert werden (vgl. Abb. 11). Dieses Ergebnis zeigt, daß im Myokard das alternative Spleißen des Fas-Transkriptes in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium so reguliert wird, daß die Anfälligkeit der Kardiomyozyten gegenüber Fas-vermittelter Apoptose im insuffizienten Myokard erhöht ist. Die negative Korrelation des Verhältnisses Fas/FasExo6Del mit der ventrikulären Auswurffraktion verdeutlicht eine protektive Wirkung der löslichen Isoform für das Myokard (Abb. 14 D).

In neonatalen Rattenkardiomyozyten konnte durch *in situ*-Hybridisierung eindeutig geklärt werden, daß Kardiomyozyten die mRNA für Fas konstitutiv exprimieren (Tanaka *et al.*, 1994). In der vorliegenden Arbeit war es durch *in situ RT-PCR* möglich, dieses Ergebnis für humanes Myokard (LV und RA) zu bestätigen (vgl. Abb. 17). Die mRNA wurde eindeutig in allen Kardiomyozyten der Gewebeschnitte nachgewiesen.

Durch Western-Blot konnte gezeigt werden, daß der Fas-Rezeptor im humanen Myokard (RA

und LV) nur in sehr geringer Menge vorkommt (vgl. Abb. 17). Bei einer Auftragung von 100 µg Gesamt-Protein konnte lediglich eine sehr schwache, spezifische Proteinbande bei 45 kDa, entsprechend dem Molekulargewicht des Fas-Rezeptors (Itoh *et al.*, 1991) detektiert werden. Diese Bande erwies sich trotz Verwendung des Chemolumineszenz-Verstärkersystems ECL für eine eindeutige Quantifizierung als zu schwach. Da 100 µg Protein aufgetrennt werden mußten, erschwerten Überladungseffekte die genaue Reproduzierbarkeit der schwachen aber spezifischen Bande. Die Verwendung von Membranfraktionen des Myokards in der Analyse führte ebenfalls zu keinem eindeutigen Nachweis von Fas (Ergebniss nicht dargestellt).

Bisher konnte in einer Vielzahl von Experimenten gezeigt werden, daß sich die Expression des Fas-Rezeptors in Kardiomyozyten infolge unterschiedlicher Stimuli ändert: Hypoxie in neonatalen Rattenkardiomyozyten induziert einen deutlichen Anstieg der mRNA (Tanaka *et al.*, 1994), durch Ischämie mit anschließender Reperfusion im Rattenmyokard oder nach extremer Überfüllung erhöht sich die Fas-Expression signifikant (Kajstura *et al.*, 1996; Yue *et al.*, 1998), während im normalen Myokard Fas nicht oder nur in einem geringen Prozentsatz der Myozyten auf Proteinebene detektiert wird. In den Untersuchungen dieser Arbeit gibt es jedoch keinen Hinweis auf eine mechanosensitive Regulation von Fas im humanen, überlasteten linksventrikulären Myokard. Auch eine durch Hypoxie induzierte Fas-Expression konnte im LV nicht nachgewiesen werden, die Expression der Patienten mit einer KHK unterschied sich nicht von der in DCM-Patienten (vgl. Tab. 5).

Bislang bekannte Daten zeigen, daß Kardiomyozyten die Fas-mRNA konstitutiv exprimieren und auch den Rezeptor an der Zelloberfläche präsentieren. Doch steht der Beweis, daß Fas an der Auslösung von Apoptose in Kardiomyozyten tatsächlich beteiligt ist noch aus. Es gibt Hinweise, daß die Aktivierung von Fas zu Dysfunktionen in isolierten Kardiomyozyten führt, die hauptsächlich elektrophysiologische Parameter und die Calcium-Homöostase der Zellen betreffen (Felzen *et al.*, 1998). Isolierte Herzen von *lpr-* (=Lymphoproliferation) Mäusen ohne funktionsfähigen Fas-Rezeptor (Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992), zeigen deutlich weniger Apoptose nach Ischämie und Reperfusion als die Herzen der Normaltiere (Jeremias *et al.*, 2000). Dieses Experiment könnte indirekt eine Beteiligung des Fas-Systems an der Auslösung von Apoptose in Kardiomyozyten beweisen.

Unsere Ergebnisse der Untersuchungen am humanen LV lassen den Schluß zu, daß Kardiomyozyten im Spendermyokard sich vor Fas-vermittelter Apoptose durch die Synthese löslicher Isoformen des Rezeptors schützen können. Dabei ist FasExo6Del die häufigste Isoform, die annähernd in gleicher Menge wie der Rezeptor vorkommt. Andere detektierbare Isoformen scheinen aufgrund ihrer geringen Expression eine unbedeutendere Rolle gegenüber FasExo6Del zu spielen. Die durch alternatives Spleißen entstehenden Isoformen des Fas-Rezeptors gelten als Antagonisten des Rezeptors (Cascino *et al.*, 1996), sie kompetieren mit dem membranständigen Rezeptor um den Liganden, der von aktivierten T-Zellen präsentiert wird oder als lösliche Form vorliegt. Das Vorkommen löslicher Fas-Isoformen und deren antiapoptotische Wirkung wurde erstmals in Kulturüberständen von T-Zell-Tumorlinien und aktivierten peripheren mononukleären Blutzellen beschrieben (Cascino *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1995; Papoff *et al.*, 1996). Neueste Studien zeigen sogar, daß lösliche Fas-Isoformen durch direkte Wechselwirkung mit der extrazellulären Domäne des Fas-Rezeptors die Auslösung von Apoptose inhibieren (Papoff *et al.*, 1999). Auch Kardiomyozyten sind in der Lage das alternative Spleißen des primären Fas-Transkriptes durchzuführen. Durch *in situ RT-PCR* mit Hilfe Exon 6 überspannender, spezifischer Primer konnte die mRNA von FasExo6Del in Kardiomyozyten nachgewiesen werden (vgl. Abb. 17 E). Die Verfügbarkeit antagonistischer Rezeptoren, sowohl löslich als auch membranär, stellt somit einen komplexen Regulationsmechanismus der Zellen bei der Auslösung der Apoptose, über Fas oder auch anderer DD-Rezeptoren dar.

Die Expression löslicher Isoformen des Fas-Rezeptors im Myokard scheint ein spezifisches Phänomen des Menschen zu sein. Weder im gesunden Myokard von Maus, Ratte, Kaninchen oder Schwein konnten durch RT-PCR mit spezifischen Primern lösliche Isoformen des Rezeptors detektiert werden (vgl. Abb. 12 und Abb. 37). Dieser Befund stellte sich bei der Suche nach einem geeigneten Modellsystem heraus, bei dem das Phänomen des alternativen Spleißens des Fas-Transkriptes in Kardiomyozyten untersucht werden könnte. Lösliche Isoformen des Fas-Rezeptors der genannten Spezies sind bisher noch nicht in der Literatur beschrieben worden. Das heißt jedoch nicht, das es keine löslichen Isoformen in diesen Spezies gibt. Möglicherweise entstehen sie auch posttranslational durch "receptor shadding", wie die lösliche Isoform des TNF-Rezeptors (Engelmann *et al.*, 1989).

Die Bildung von löslichen Isoformen des Fas-Rezeptors im gesunden Herzen des Menschen ist als ein protektiver Effekt gegenüber Fas-vermittelter Apoptose zu werten. Dieser Schutz geht bei terminaler Herzinsuffizienz verloren. Interessanterweise kommt diese mutmaßliche Herzprotektion nicht in allen Säugern vor.

Von der Bildung von Fas und löslicher Fas-Isoformen im Myokard unabhängig, sind zirkulierende, lösliche Fas-Rezeptor-Isoformen (sFas = soluble Fas) auch im Serum oder Plasma von Patienten nachweisbar. In diesen Untersuchungen wurde im ELISA-Test eine um etwa das doppelte erhöhte Konzentration von sFas bei herzinsuffizienten Patienten mit NYHA 4 im Vergleich zu Normalpatienten ermittelt (Nishigaki *et al.*, 1998; Nishigaki *et al.*, 1997; Okuyama *et al.*, 1997). Zirkulierende, nachweisbare lösliche Isoformen von Fas sind also bei Herzinsuffizienz erhöht, wenn deren Expression im Myokard herabreguliert ist.

Es scheint also ein direkter Zusammenhang zwischen der Herzinsuffizienz und dem erhöhten Vorkommen von löslichen, zirkulierenden DD-Rezeptor-Isoformen zu bestehen, wie dies auch für die löslichen Formen des verwandten TNF-Rezeptors, sTNF-R I und II, gezeigt werden konnte (Okuyama *et al.*, 1997; Torre-Amione *et al.*, 1996). Dabei wird diskutiert, daß die löslichen Rezeptoren den vermehrt vorkommenden Liganden TNF α binden, um so Zellschädigungen oder Apoptose im Myokard oder in anderen Organen vorzubeugen (Okuyama *et al.*, 1997). Die 1-Jahres-Überlebens-Prognose der Patienten der Gruppe mit einem besonders hohen sFas-Wert war deutlich besser, als die mit einem vergleichbar niedrigen, obwohl sFas bei einer Genesung wieder deutlich absinkt (Nishigaki *et al.*, 1998). Zirkulierendes sFas scheint somit tatsächlich protektive Effekte zu induzieren. Ob der Schutz sich auf das Myokard oder andere Organe auswirkt ist allerdings offen.

Die Frage nach der Herkunft sowie dem Ort der Wirkung von zirkulierendem sFas bei Herzinsuffizienzpatienten ist also noch unklar. Durch *in situ RT-PCR* konnte, wie bereits erwähnt, geklärt werden, daß Kardiomyozyten des Spendermyokards die mRNA für FasExo6Del bilden. Es wurde aber auch gezeigt, daß das Myokard dies im Endstadium der Herzinsuffizienz einstellt. Dies spricht dafür, daß zirkulierendes sFas überwiegend aus dem peripheren nicht kardialen Gewebe stammt. Daten von Nishigaki *et al.* (1997) belegen diese Vermutung: Blutproben, die Patienten aus verschiedenen Bereichen des Herzens während einer Herzkatheteruntersuchung entnommen wurden, zeigten keine nennenswerten Unterschiede im sFas-Niveau. Die Tatsache, daß sFas im Blut der Normalpatienten niedrig ist, liegt möglicherweise darin begründet, daß das Myokard nur eine unbedeutende Quelle für sFas darstellt. Demnach sollten geringe Konzentrationen im interstitiellen Raum für eine protektive Wirkung im normalen Myokard ausreichend sein.

Weiterhin wurde auch die mRNA-Expression des zugehörigen spezifischen Apoptose induzierenden Fas-Liganden in humanen Myokardproben untersucht. Es wurde ursprünglich vermutet, daß sich die Expression von FasL auf immunprivilegierte Zellen und Gewebe, wie aktivierte T-Zellen, natürliche Killerzellen, Testis oder Endothelzellen der vorderen Kammer des Auges beschränkt (zur Übersicht: Schulze-Osthoff *et al.*, 1998). In humanen Myokardproben konnte insgesamt nur eine sehr niedrige Expression der mRNA des Fas-Liganden mittels RT-PCR detektiert werden (vgl. Abb. 25). Die Quantifizierung zeigte dennoch eine deutlich erhöhte Expression im insuffizienten Myokard, während in den Spendern die FasL-mRNA kaum nachweisbar war. Eine besonders erhöhte Expression von FasL konnte in Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie beobachtet werden (vgl. Abb. 26). Oftmals geht einer DCM eine bakterielle oder virale Infektion voraus, so daß Entzündungen im Myokard beobachtet werden (Willerson und Cohn, 1995). An Entzündungsreaktionen sind FasL-präsentierende Zellen der Immunabwehr beteiligt, die ins Gewebe infiltriert werden und somit zur Expression von FasL im Myokard beitragen könnten. Möglicherweise sind es auch die Kardiomyozyten selbst, die den FasL als einen Abwehrmechanismus bilden, denn es gibt die Vermutung, daß Kardiomyozyten selbst im Normalzustand oder nach Ischämie den FasL exprimieren (De Wegner *et al.*, 1999; Jeremias *et al.*, 2000), dies könnte die gering nachweisbare mRNA im Spendermyokard und in den KHK-Patienten erklären. Es gibt aber auch die Überlegung, daß die Präsentation von FasL auf der Oberfläche der Kardiomyozyten einen Schutz gegen zytotoxische T-Zellen bei Abstoßungsreaktionen nach einer Herztransplantation sein könnte (Hoffen, 1998, De Wegner *et al.*, 1999).

Yamaguchi *et al.* (1999) beobachteten einen deutlichen Anstieg der löslichen Form von FasL im Serum von Patienten mit Herzinsuffizienz im Vergleich zu Normalpatienten. Dabei wird diskutiert, daß die Höhe des Wertes mit dem Schweregrad der Krankheit korreliert. Das Myokard ist dabei eine Quelle für FasL, wie Messungen von Blutproben nach Herzkatheteruntersuchungen ergaben (Yamaguchi *et al.*, 1999). Diese Daten bestätigen die Ergebnisse einer früheren Veröffentlichung von Toyozaki *et al.* (1998), stehen aber im Gegensatz zu den Messungen von Nishigaki *et al.* (1997), die keine Veränderungen des FasL im Plasma herzinsuffizienter Patienten finden konnten. Für das Zytokin TNF α , das in seiner Struktur dem FasL sehr ähnlich ist, konnte eindeutig geklärt werden, daß es vom insuffizienten Myokard sekretiert wird (Torre-Amione *et al.*, 1996) und zu Funktionsstörungen und Apoptose von Kardiomyozyten führt (Krown *et al.*, 1996; Bozkurt *et al.*, 1998). Daher liegt aufgrund der aufgeführten Daten die Spekulation nahe, daß der FasL einer ähnlichen Regulation unterliegen könnte.

Die bekannten Daten belegen eindeutig eine Beteiligung des Fas/FasL-Systems an der Entstehung bzw. dem Verlauf der Herzinsuffizienz. Die Regulationsmechanismen sind jedoch sehr komplex, so daß zum Zeitpunkt noch unklar ist, welche Bedeutung den einzelnen Komponenten des Systems zukommt.

5.1.3 Myokardiale Apoptose und Expression des Fas-Rezeptors im humanen Myokard nach mechanischer Entlastung durch ein ventrikuläres Assist-System (VAD, Kunstherz)

Die Transplantation des Herzens ist weltweit als chirurgische Therapie zur Behandlung der Herzinsuffizienz im Endstadium anerkannt (Stevenson, 1998); die Häufigkeit der Transplantation wird jedoch durch die Verfügbarkeit von Spenderherzen begrenzt. Die Implantation eines ventrikulären Unterstützungssystems (ventricular assist device: VAD) wird daher seit einigen Jahren erfolgreich praktiziert, um den Patienten im Endstadium der Herzinsuffizienz das Überleben zu sichern und die Zeit zu überbrücken, bis ein geeignetes Spenderherz zur Verfügung steht (Goldstein *et al.*, 1998). Dabei wird die ursprüngliche Funktion des Ventrikels durch eine mechanische Pumpe unterstützt und somit die Versorgung des Organismus gewährleistet.

Zahlreiche Studien belegen, daß sich das Myokard durch die Entlastung durch ein VAD erholt und eine Funktionsverbesserung (recovery) erfährt, man spricht sogar von einer Umkehr der Kardiomyopathie (Levine *et al.*, 1995; Loebe *et al.*, 1999) oder der Mechanismen, die eine Rolle beim myokardialen "Remodeling" spielen und zum Fortschreiten der Herzinsuffizienz beitragen (Mann und Willerson, 1998; Zafeiridis *et al.*, 1997). Die Überbrückung durch das VAD erhöht zudem auch die Überlebensrate der Patienten nach einer Transplantation (Frazier *et al.*, 1995). Einige Patienten wurden schon erfolgreich vom VAD entwöhnt, da ihr Herz die ursprüngliche Funktion ohne externe Unterstützung wieder aufnehmen konnte (Loebe *et al.*, 1999; Loebe *et al.*, 1997; McBride *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 1997); ein Schritt, der als mögliche Alternative zur Transplantation diskutiert wird.

Molekulare Mechanismen, die zur Erholung des Myokards führen, sind jedoch noch unklar. Der Einsatz eines VAD bedingt eine Verminderung der Insuffizienz bedingten Überlast des Myokards, so daß die Auswirkungen auf die Apoptose und die Reversibilität von Phänotypveränderungen analysiert werden können. Für die vorliegende Arbeit standen Myokardproben des linken Ventrikels von 10 Patienten vor Implantation eines ventrikulären Unterstützungssystems (Zustand der extremen Überdehnung) und nach Ausbau während der Transplantation (nach mehrmonatiger Entlastung durch ein VAD) zur Verfügung. Der paarweise Vergleich dieser Proben aus dem gleichen Herzen erlaubt die direkte Dokumentation der Wirkung der Entlastung.

Die Ermittlung des apoptotischen DNA-Leiterscores bestätigte ein erhöhtes Auftreten von Apoptose im Myokard vor Einbau des VAD. In Myokardproben der gleichen Patienten nach VAD-Entlastung konnte ein deutlicher Rückgang des Verlustes von Zellen durch Apoptose beobachtet werden (vgl. Tab. 12). Dies entspricht auch den Untersuchungen von Grunstein *et al.* (1997), die eine verringerte Anzahl TUNEL-positiver Myozytenkerne in 6 von 7 Myokardproben nach VAD-Entlastung finden konnten. Diese verminderte Apoptose ist mit der Verringerung der ventrikulären Wandspannung und der damit geringeren mechanischen Belastung der Kardiomyozyten durch den Einsatz des VAD erklärbar. Die Normalisierung der ANP-Expression in den untersuchten post-VAD-Proben beweist die nachlassende Überlast des Myokards (Bartling *et al.*, 1999). Somit stützt diese Untersuchung an VAD-Patienten die Hypothese, daß eine erhöhte mechanische Belastung zur vermehrten Apoptose von Myozyten im insuffizienten Herzen führt. Die Quantifizierung der Expression des Apoptose auslösenden Fas-Rezeptors und seiner löslichen Isoform FasExo6Del vor Einbau des VAD zeigte einen vergleichbaren Apoptose anfälligen Phänotyp wie die terminal insuffizienten Herzen: eine geringe, kaum nachweisbare Expression von FasExo6Del und somit ein erhöhtes proapoptotisches Verhältnis Fas/FasExo6Del (vgl. Tab. 6).

Nach VAD konnte eine leicht erhöhte Expression von FasExo6Del beobachtet werden, so daß sich das Verhältnis Fas/FasExo6Del verringerte und sich dem "Normalzustand" in den Spenderherzen annäherte. Bei den DCM-Patienten korrelierte die prozentuale Änderung des Verhältnisses Fas/FasExo6Del mit der Dauer der Unterstützung (vgl. Abb. 15A). Eine "Normalisierung" des Phänotypes des Myokards nach VAD-Entlastung wurde auch für verschiedene Mitglieder der Bcl-2-Familie und Molekülen der Calcium-Homöostase (Na⁺-Ca²⁺-Exchanger und SERCA = sarkoplasmatische Ca²⁺-ATPase) gezeigt (Bartling *et al.*, 1999).

Das Patientenkollektiv in der vorliegenden Arbeit enthielt auch zwei KHK-Patienten, deren verändertes Verhältnis Fas/FasExo6Del vor und nach Einbau des VAD aufgrund der Gegensätzlichkeit beider Werte nicht mit in die zeitabhängige Korrelation einging. In klinischen Studien wurde festgestellt, daß DCM-Patienten oft eine bessere Prognose bei der Entwöhnung vom VAD haben als KHK-Patienten (Loebe *et al.*, 1999). Solch eine Entwöhnung ist durchaus vom Ausmaß irreversibler Schädigungen des Myokards abhängig, die bei KHK-Patienten als Folge großer Myokardverluste nach Infarkt und damit verbundener Narbenbildung und Fibrosierung als besonders hoch einzustufen sind.

Durch die Entlastung erfährt das insuffiziente Myokard also verschiedene Umstrukturierungen, die sich auf das Ausmaß der Apoptose, sowie die Expression Apoptose relevanter Gene auswirken, es erfolgt eine Annäherung an den "Normalzustand", der jedoch bei weitem nicht erreicht wird. Es ist wohl auch nicht zu erwarten, daß eine vollständige Normalisierung eines Herzens, daß kurz vor dem kompletten Funktionsverlust stand, innerhalb weniger Wochen erreicht werden kann. Zudem gibt es auch einen Anteil von Patienten, der durch den Einbau eines VAD keine Verbesserung erfährt (Westaby und Coats, 1998). Vielleicht wären die Überlebensraten der Patienten besser, wenn das VAD nicht erst zur Überbrückung der Zeit bis zur Transplantation, sondern als therapeutische Maßnahme wesentlich früher implantiert werden würde.

Die Untersuchungen passen in das Konzept, daß die Herzinsuffizienz zu einem gewissen Maße reversibel ist (Levine *et al.*, 1995; Loebe *et al.*, 1999).

5.1.4 Spielt alternatives Spleißen bei der Auslösung von Apoptose eine Rolle?

Die Herabregulation alternativ gespleißter Isoformen des Fas-Rezeptors weist auf ein verändertes alternatives Spleißen des Fas-Transkriptes im erkrankten Myokard hin (vgl. Abb. 11).

Alternatives Spleißen erhöht die Variabilität der genetischen Information, so daß aus einer genomischen Sequenz posttranskriptional Proteine unterschiedlicher Struktur und Funktion entstehen können (Valcarcel und Green, 1996); wie das auch bei Fas der Fall ist. Dies ist zum Beispiel auch für verschiedene Gene bekannt, die kontraktile Proteine kodieren (Breitbart *et al.*, 1987; Ruiz-Opazo und Nadal-Ginard, 1987). Im überlasteten oder insuffizienten Myokard tragen Änderungen des alternativen Spleißens der Primärtranskripte solcher Proteine, wie zum Beispiel Troponin T, zur Modifikation des myokardialen Phänotyps bei (Anderson *et al.*, 1995; Mesnard *et al.*, 1995).

Wichtige Funktionen beim konstitutiven und alternativen Spleißen übernehmen SR-Proteine (Proteine mit C-terminaler Serin/Arginin-Domäne) (Screaton *et al.*, 1995; Zahler *et al.*, 1993). Ihre Funktion, wie beispielsweise die Selektion alternativer mRNA-Spleißstellen wird durch reversible Phosphorylierungen reguliert (Ge und Manley, 1991; Krainer *et al.*, 1990). Apoptose spezifische Phosphorylierungen von SR-Proteinen und das dadurch veränderte alternative Spleißen Apoptose modulierender Faktoren wäre als ein neuer Mechanismus bei der Regulation von Apoptose denkbar (Utz *et al.*, 1998). Grundlegende Funktionsveränderungen durch alternatives Spleißen der Primärtranskripte wichtiger Apoptoseregulatoren sind nicht nur für Fas bekannt. Auch in der Familie der Bcl-Proteine gibt es ein Beispiel: aus dem Transkript des antiapoptotischen Bcl-x_L kann die proapoptotische Form Bcl-x_S entstehen (Boise *et al.*, 1993). Eine ähnlich Regulation wurde auch für Caspase-2 beobachtet, deren große Spleißvariante proapoptotisch wirkt, die kürzere hingegen antiapoptotisch (Shaham und Horvitz, 1996). Auf der Ebene der DD-Rezeptoren gibt es ebenfalls ein weiteres Beispiel, den für Lymphozyten spezifischen Rezeptor DR3, von dem 11 Spleißprodukte mit unterschiedlichen Funktionen bekannt sind (Screaton *et al.*, 1997).

Das verminderte Vorkommen antiapoptotischer löslicher Isoformen des Fas-Rezeptors könnte auf eine veränderte Funktion verschiedener Spleißfaktoren im insuffizienten humanen Myokard zurückzuführen sein. Neben Fas und TNF-RI waren zum Zeitpunkt der Untersuchungen 3 weitere DD-enthaltende, Apoptose auslösende Rezeptoren bekannt: DR3, DR4 und DR5 sowie deren Antagonist DcR1, der keine funktionelle DD enthält. Auch diese Rezeptoren werden konstitutiv im Myokard exprimiert (Pan *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 1997; Sheridan *et al.*, 1997) und könnten durch eine veränderte Expression die Apoptoseanfälligkeit der Kardiomyozyten beeinflussen. Um ein vollständiges Bild der mRNA-Expression von DR4, DR5 und DcR1 bei der Herzinsuffizienz zu erhalten, wurde diese im humanen Myokard mittels Standard kalibrierter, kompetitiver RT-PCR untersucht. DR3 ist ein Rezeptor, der lediglich von Lymphozyten exprimiert wird (Screaton *et al.*, 1997). In unserem Labor wurden Untersuchung vorgenommen, DR3 mittels RT-PCR im humanen Myokard nachzuweisen, es konnte jedoch nur eine äußerst geringe Menge seines Transkriptes gefunden werden (unveröffentlichtes Ergebnis).

Während die mRNA-Expression von DR4 und DcR1 keinerlei Veränderungen im insuffizienten Myokard im Vergleich zu den Spendern zeigte, konnte eine signifikante Herabregulation von DR5-mRNA im insuffizienten Myokard beobachtet werden (vgl. Abb. 20). DR5 konnte auf Proteinebene im Western nicht quantifiziert werden, da zum Zeitpunkt der Untersuchungen noch kein kommerziell erhältlicher spezifischer Antikörper gegen DR5 verfügbar war.

Auch von DR5 wurden 2 Spleiß-Isoformen beschrieben, die sich in der extrazellulären Domäne um 29 Aminosäuren unterscheiden, jedoch keine unterschiedliche Funktion bei der Auslösung von Apoptose besitzen (Screaton *et al.*, 1997). Durch die Wahl der spezifischen PCR-Primer konnten beide Isoformen in der optimierten RT-PCR unterschieden und im humanen Myokard detektiert werden. Es konnten jedoch keine Unterschiede im Vorkommen der Isoformen von DR5 im Myokard gefunden werden (vgl. Abb. 19).

Die DD-Rezeptoren DR4 und DR5 sind im humanen Organismus ubiquitär exprimiert (Pan *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 1997; Schneider *et al.*, 1997), ebenso wie ihr endogener Ligand TRAIL (Wiley *et al.*, 1995). Die Herabregulation von DR5 im insuffizienten Myokard stellt möglicherweise eine Schutzfunktion gegen vermehrt auftretende apoptotische Stimuli dar.

Obwohl beide Rezeptoren im Myokard exprimiert werden, gibt es bisher jedoch noch keine Hinweise darauf, daß über DR4 oder DR5 Apoptose in Kardiomyozyten ausgelöst werden kann. Die bislang vorliegenden Untersuchungen beschränkten sich auf andere Zellsysteme. Zudem ist noch wenig darüber bekannt, welche intrazellulären Moleküle das apoptotische Signal ins Zellinnere leiten, dabei wird die Beteiligung von FADD kontrovers diskutiert (Marsters *et al.*, 1996; Pan *et* Pan *et al.*, 1997; Walczak *et al.*, 1997), die Aktivierung von Caspasen ist dagegen unumstritten (Mariani *et al.*, 1997). Walczak *et al.* (1997) charakterisierten DR4 und DR5 als biochemisch und funktionell unterschiedliche Rezeptoren und stellten somit die Möglichkeit in den Raum, daß durch einen Auslöser, den Liganden TRAIL, unterschiedliche apoptotische Signalwege eingeschlagen werden können. Die unterschiedliche Regulation der mRNA-Expression beider Rezeptoren bei Herzinsuffizienz paßt zu funktionellen Unterschieden.

Für den DR4- und DR5-Liganden TRAIL waren bereits spezifische Antikörper kommerziell verfügbar, so daß die membranäre Form des Liganden im Western-Blot durch eine spezifische Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 32 kDa detektiert werden konnte (vgl. Abb. 20); lösliches TRAIL, das durch proteolytische Spaltung von der membranären Form entsteht (Mariani und Krammer, 1998), konnte nicht nachgewiesen werden. Die Quantifizierung ergab, daß der Ligand TRAIL auf Proteinebene im insuffizienten Myokard gegenüber dem Spendermyokard etwa auf das Doppelte erhöht ist (vgl. Abb. 23).

TRAIL wurde als ein neues Mitglied der Zytokine der TNF-Familie identifiziert und kann Apoptose unabhängig von Fas oder TNF vermitteln (Pitti *et al.*, 1996; Wiley *et al.*, 1995). Die biologische Bedeutung von TRAIL ist jedoch noch unklar. TRAIL wird von vielen Zellen und Geweben konstitutiv exprimiert, ist aber *in vivo* nicht immer zytotoxisch (Wiley *et al.*, 1995). Dieses Phänomen kann zum einen damit erklärt werden, daß viele Körperzellen, wie auch Kardiomyozyten, sogenannte Köderrezeptoren für TRAIL exprimieren (Walczak *et al.*, 1997) und zum anderen damit, daß zusätzliche Stimuli für die Auslösung von Apoptose über diesen Signalweg notwendig sind. An isolierten Rattenkardiomyozyten konnte zum Beispiel gezeigt werden, daß sie konstitutiv resistent gegenüber TRAIL und auch anderen Apoptose auslösenden Liganden sind (Jeremias *et al.*, 2000). Dies ändert sich jedoch nach einer experimentellen Ischämie mit anschließender Reperfusion. Die Kardiomyozyten selbst tragen dabei zu einer vermehrten Freisetzung dieser Liganden bei, wobei auch eine erhöhte mRNA-Expression gemessen wurde. Möglicherweise werden die Kardiomyozyten durch Streßsituationen sensitiver gegenüber TRAILvermittelter Apoptose (Jeremias *et al.*, 2000).

Die vermehrte Produktion von TRAIL im terminal insuffizienten Myokard (vgl. Abb. 23) könnte aber auch als Abwehrmechanismus gegen in das Gewebe infiltrierende Zellen, die wiederum andere toxische Ereignisse hervorrufen, diskutiert werden.

Der sogenannte Köderrezeptor DcR1, der TRAIL binden kann ohne Apoptose auszulösen, wird von normalen Körperzellen exprimiert, nicht jedoch von den meisten Tumorzellen (Gura, 1997; MacFarlane *et al.*, 1997). Das Vorhandensein von Köderrezeptoren bietet somit normalen Zellen einen Schutz gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose. Daher scheint es verwunderlich, daß die

ohnehin im Vergleich zu DR4 oder DR5 schon sehr niedrige mRNA-Expression von DcR1 unverändert bleibt, obwohl TRAIL im insuffizienten Myokard erhöht ist. Die Quantifizierung von DcR1 beschränkte sich hier wiederum auf die Transkriptionsebene, da noch kein Antikörper erhältlich war.

Diese Ergebnisse zeigen, daß auch das TRAIL-System bei terminaler Herzinsuffizienz des Menschen deutlichen Veränderungen unterliegt, deren Funktionen jedoch noch offen sind.

Der Vollständigkeit halber wurde auch die mRNA-Expression des TNF-Rezeptors I (TNF-RI) im humanen Myokard analysiert (vgl. 4.3). Es wurden keine Unterschiede in der Expression zwischen Spender- und insuffizientem Myokard beobachtet. Dieses Ergebnis bestätigt bereits veröffentlichte Daten, daß der TNF-Rezeptor konstitutiv im Myokard exprimiert wird (Torre-Amione *et al.*, 1995; Torre-Amione *et al.*, 1996). Posttranslationale Veränderungen an TNF-Rezeptoren im insuffizienten Myokard und deren Wirkung sind bereits beschrieben (Torre-Amione *et al.*, 1996).

5.1.6 Sind die Komponenten des apoptotischen Signalweges der DD-Rezeptoren im Myokard exprimiert?

Neben der Expression der Apoptose auslösenden Rezeptoren oder Liganden konnte auch die mRNA-Expression einiger bekannter Elemente ihrer apoptotischen Signalkaskade, wie der Adaptermoleküle FADD und TRADD, Caspase-8 und FLIP, im Myokard eindeutig durch RT-PCR nachgewiesen werden (vgl. Abb. 25). Das Myokard hat demnach das Potential, diesen Signalweg zu beschreiten. Die Quantifizierung ergab, daß die Expression der genannten Moleküle auf mRNA-Ebene keinen Veränderungen bei terminaler Herzinsuffizienz unterliegt (vgl. Abb. 26). Demnach ist im Myokard zur Auslösung von Apoptose keine erhöhte Expression der Moleküle dieses Signalweges notwendig.

Die Regulation der Aktivität von Initiator-Caspasen, wie Caspase-8, ist von großer Bedeutung bei der Auslösung von Apoptose. Sie kann durch Autoaktivierung nach Komplexbildung mit Adaptermolekülen infolge einer Stimulation von DD-Rezeptoren oder durch Blockierung dieser Komplexierung durch Interaktion mit inhibitorischen Molekülen, wie zelluläre und virale FLIPs, erfolgen (Kumar und Colussi, 1999; Thome *et al.*, 1997; Tschopp *et al.*, 1998). Dies zeigt, daß die Regulation der Caspaseaktivität hauptsächlich posttranslational erfolgt und auf Protein-Protein-Wechselwirkungen beruht. Das scheint sich auch für Caspase-8 im Myokard zu bestätigen: bei Herzinsuffizienz ist ihre mRNA-Expression unverändert, andererseits kann ihre Aktivierung aufgrund der vorliegenden Apoptose vermutet werden.

Änderungen der mRNA-Expression von FLIP, welches die Aktivierung von Caspase-8 verhindert und somit antiapoptotisch wirkt, konnten aber ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Auch das alternative Spleißen des Primärtranskriptes von FLIP in FLIPs und FLIPL unterliegt bei der Herzinsuffizienz keinen Veränderungen (vgl. Abb. 26 und Tab. 11). Bisher konnten für beide Isoformen auch keine prinzipiell gegensätzlichen Funktionen nachgewiesen werden. FLIP, der Name leitet sich ursprünglich von "FLICE inhibitory protein" ab, wurde als humanes Homolog von viralen Apoptoseinhibitoren identifiziert (Irmler et al., 1997). Zum Schutz des Körpers vor viralen Infektionen werden infizierte Zellen einem apoptotischen Programm unterworfen. Um diesem Prozeß entgegenzuwirken haben Viren eine Reihe verschiedener Mechanismen entwickelt, die in das apoptotische Programm blockierend eingreifen. Daß auch normale Körperzellen über solche homologen Proteine verfügen, beweist deren außerordentliche Rolle bei der Regulation der Apoptose. Es ist wahrscheinlich, daß die Verfügbarkeit von FLIP auch posttranslational im humanen Myokard erfolgt. In vivo-Versuche an Ratten zeigten bereits, daß nach Myokardinfarkt in TUNEL-positiven Kardiomyozyten im Vergleich zu normalen Kardiomyozyten FLIP deutlich herabreguliert ist (Rasper et al., 1998). Im humanen Myokard wurde FLIP bisher auf Proteinebene noch nicht nachgewiesen.

Durch gezielte Expressionsanalysen konnten auf der Ebene der DD-Rezeptoren und ihrer Liganden deutliche Phänotypveränderungen bei terminaler Herzinsuffizienz im linken Ventrikel mit deutlichen Anzeichen von Apoptose beschrieben werden:

- Anstieg des proapoptotischen Verhältnisses Fas/FasExo6Del, das bei hämodynamischer Entlastung wieder leicht absinkt
- erhöhte Expression von FasL in DCM-Patienten
- Herabregulation des Apoptose auslösenden DR5
- erhöhte Proteinexpression des Liganden TRAIL.

Mit Ausnahme der Herabregulation von DR5 passen all diese Veränderungen zu einer erhöhten Apoptoseanfälligkeit des insuffizienten Herzens. Das Ausmaß dieser Erhöhung kann gegenwärtig noch nicht beurteilt werden. Die vorgestellten Veränderungen im Apoptose regulierenden DD-Rezeptor-System sind aber alle in Myokardbiopsien quantifizierbar und könnten als Indikatoren der Überlast-induzierten Herzinsuffizienz in Biopsien genutzt werden.

Möglicherweise spielt der Apoptose auslösende Weg über DD-Rezeptoren aber nur eine untergeordnete Rolle in Zellen, wie den Kardiomyozyten, in denen Mitochondrien etwa 30% des Volumens einnehmen. Daher könnte die mitochondriale Regulation der Apoptose, die einleitend dargestellt wurde (vgl. 1.7), hier vongrößerer Bedeutung sein (Schellenberger *et al.*, 2000). Tatsächlich wurde im terminal insuffizienten Myokard vermehrt zytosolisches Cytochrom c, das eine wesentliche Rolle bei der Bildung eines Apoptosoms und der Aktivierung der Caspase-Kaskade spielt (Abb. 2), beobachtet, während im gesunden Myokard Cytochrom c vornehmlich in den Mitochondrien lokalisiert ist (Narula *et al.*, 1999). Einhergehend mit der Translokation von Cytochrom c wird zunehmend aktivierte Caspase-3 beobachtet. Diese Daten zeigen, daß das apoptotische Programm im insuffizienten Myokard in etwa 50% der Kardiomyozyten bereits aktiviert ist, jedoch nur ein minimaler Teil der Zellen auch TUNEL-positiv ist (Narula *et al.*, 1999). Man spricht hier von frühen Stadien einer zytosolischen Apoptose der Kardiomyozyten, die möglicherweise zu einem gewissen Grad reversibel sind (Darmer *et al.*, 2000; Schellenberger *et al.*, 2000), während Kernapoptose erst in einer späteren Phase stattfindet.

Es scheint auch extrem schwierig, pharmakologische Ansätze zu finden, die Apoptose im Kardiomyozyten unterbinden. Zum einen ist es nicht sinnvoll geschädigte Zellen zu erhalten, die ihre Funktion nur noch eingeschränkt oder gar nicht mehr erfüllen. Sie könnten dem Organ insgesamt mehr schaden als nutzen, beispielsweise durch die Ausprägung von Arrythmien im Myokard infolge von Funktionsverlusten bei der Signalübertragung. Es ist daher von Bedeutung, zusätzlich eine Regeneration der Funktion der Zellen zu erzielen, die scheinbar nur durch eine mechanische Entlastung, wie das bei der Unterstützung des Myokards durch den Einbau eines VAD der Fall ist, erreicht werden kann.

Zum anderen müßte, um den Verlust von kontraktilen Zellen einzuschränken, eine Apoptoseprävention entwickelt werden, die gezielt auf Kardiomyozyten wirkt. Gerade bei Krankheiten wie Krebs liegt eine Störung der Apoptose vor, die sich in einer unkontrollierten Proliferation des Tumors äußert. Die Gabe von allgemein antiapoptotisch wirkenden Stoffen könnte die Entstehung und das unkontrollierte Wachstum von Tumoren begünstigen.

5.2 Apoptose im Modellsystem kultivierter Kaninchentrabekel

Wie einleitend ausführlich dargestellt (vgl. 1.1), sind Kardiomyozyten im insuffizienten Myokard einer andauernden hohen mechanischen Belastung ausgesetzt, bedingt durch eine pathologische hämodynamische Überlast. Diese erhöhte mechanische Beanspruchung wird als eine mögliche Ursache für ein vermehrtes Auftreten apoptotischer Zelluntergänge von Kardiomyozyten im überlasteten Myokard diskutiert (Bing, 1994). Durch Dehnung ganzer Papillarmuskel (Cheng *et al.*, 1995) oder adulter Kardiomyozyten auf Membranen (Leri *et al.*, 1998; Leri *et al.*, 1999) wur-

de diese in vivo-Situation bisher versucht, in vitro nachzuempfinden. Diese artifiziellen Modelle können jedoch den Zusammenhang zwischen Apoptose und Überlast nicht eindeutig beweisen. Die extreme Überdehnung von Papillarmuskeln der Ratte *in vitro* führt zwar zu einem auffälligen Ansieg der Apoptoserate von Kardiomyozyten einhergehend mit einer Neuanordnung der Zellen (Cheng et al., 1995). Jedoch kommt eine solche starke Überdehnung von Muskeln in dem hier angewandten Ausmaß in vivo niemals vor. Adulte Kardiomyozyten der Ratte in Kultur weisen bereits eine relativ hohe basale Apoptoserate auf (Leri et al., 1998; Leri et al., 1999). Ein Vergleich des apoptotischen DNA-Leiterscores von Kardiomyozyten aus intaktem Myokard mit isolierten Kardiomyozyten in Kultur in der vorliegenden Arbeit zeigte ebenfalls diese hohe Basalapoptose der Zellen in Kultur und damit den dramatischen Unterschied zwischen Gewebe und Zellkultur (vgl. 4.4.5 und Abb. 31). Diese starke Aktivierung des apoptotischen Programms in isolierten Zellen ohne Applikation eines apoptotischen Stimulus wird in Zusammenhang mit der Auflösung ursprünglich bestehender Zellkontakte und Zytoskelettverankerungen infolge enzymatischer und mechanischer Vereinzelungsmechanismen bei der Präparation gebracht und als Anoikis (durch Vereinzelung induzierte Apoptose) bezeichnet (Frisch und Rouslahti, 1997; Meredith und Schwartz, 1997). Extrem überdehnte Papillarmuskeln oder gedehnte kultivierte Kardiomyozyten sind daher zur Untersuchung der physiologischen Relevanz von Überlast-induzierter Apoptose weniger geeignet.

Im Modellsystem der kultivierten, multizellulären Kaninchentrabekel (Abb. 3) läßt sich die mechanische Belastung (Dehnung) von Kardiomyozyten eines Herzmuskelpräparates im physiologisch relevanten Bereich und ohne jeglichen hormonellen Einflüsse experimentell durchführen (Janssen *et al.*, 1998). Dieses System betrachtet Kardiomyozyten in ihrem ursprünglichen Gewebeverband, mit der Verwendung intakter Muskelstreifen (Trabekel) wird das Problem der Vereinzelung umgangen. Die Versorgung der Zellen im inneren Bereich des Präparates wird während der Kultivierung im Organbad aufgrund des geringen Durchmessers der Trabekel durch Diffusion gewährleistet, so daß keine anoxischen Kerne entstehen. In ersten Versuchen konnte geklärt werden, daß die Trabekel hinsichtlich ihrer muskelphysiologischen Parameter und Proteinsyntheserate über 48 h stabil sind. Die kontraktile Reserve des Muskels bei Anstieg der Ca²⁺-Konzentration oder bei β-adrenerger Stimulation bleibt über diesen Zeitraum erhalten (Janssen *et al.*, 1998).

In der vorliegenden Arbeit konnte mit diesem Trabekelmodell zum ersten mal gezeigt werden, daß chronische Überlast (Dehnung) von intaktem, kontrahierenden Myokard zur Auslösung von Apoptose in Kardiomyozyten führt. Für diese Untersuchungen wurden unterschiedliche Dehnungszustände, die im klinisch relevanten Bereich liegen (L_{max} wurde dabei nicht überschritten) betrachtet (vgl. 2.3). Eine chronische Dehnung der Trabekel über 48 h auf die maximale Muskellänge (L_{max} ; Vor- und Nachlast) führte zu einer massiven Apoptose im kontrahierenden Muskel, die durch den Nachweis der apoptotischen DNA-Fragmentierung identifiziert wurde. Eine TUNEL-Färbung auf Gewebeschnitten gedehnter Trabekel zeigte, daß Kardiomyozyten von apoptotischen DNA-Veränderungen betroffen waren. Dabei scheinen TUNEL-positive Zellen meist intakt, d.h. sie wiesen noch keine typischen morphologischen Veränderungen auf, die durch ein Lichtmikroskop erkennbar wären. Die deutlich langsamere Kontraktion der gedehnten Trabekel innerhalb des Kultivierungszeitraumes zeigt möglicherweise erste Effekte der einsetzenden Apoptose im Präparat auf die Muskelphysiologie.

In einer Zeitkurve konnte in den gedehnten Trabekeln erst innerhalb von 6 bis 24 h eine erhöhte Apoptosehäufigkeit gefunden werden, die binnen weiterer 24 h nicht weiter anstieg (vgl. 4.5.2). Dieses Ergebnis spricht für eine langsamere Auslösung von Apoptose in Kardiomyozyten unter physiologisch relevanten Bedingungen. Die extrem überdehnten Papillarmuskel zeigten bereits nach 3 h einen Anstieg der Apoptoserate und isolierte Kardiomyozyten nach etwa 4 h (Cheng *et al.*, 1995; Leri *et al.*, 1998; Leri *et al.*, 1999).

Ein Vergleich unterschiedlicher Dehnungszustände zeigte, daß bereits eine leichte Dehnung zu Apoptose im Muskel führte, die jedoch gemessen am apoptotischen DNA-Leiterscore ein geringeres Ausmaß hatte als eine chronische Dehnung auf L_{max} . Trabekel ohne mechanische Beanspruchung wiesen hingegen kaum Zeichen einer apoptotischen DNA-Fragmentierung auf (vgl. Abb. 36).

Aus diesen Ergebnissen läßt sich schlußfolgern, daß eine erhöhte mechanische Belastung ohne hormonelle Einflüsse Apoptose im kontrahierenden, intakten Myokard induzieren kann. Es wird damit erstmals gezeigt, daß eine erhöhte Überlast, wie sie bei der Herzinsuffizienz vorkommt, und die damit verbundene mechanische Beanspruchung der Kardiomyozyten als ein Auslöser für myokardiale Apoptose in Frage kommt. Unklar bleibt jedoch, ob der Stimulus zur nachweisbaren Apoptose in den ungedehnten Trabekeln, die in ihrem Ausmaß recht variabel war und die breite Streuung der Werte verursachte, durch die Präparation oder durch die Kultivierung über 48 h gegeben wurde.

Eine bedeutende Rolle bei der Auslösung von Apoptose spielen Proteine der Bcl-2-Familie (Adams und Cory, 1998). In den Kaninchentrabekeln in der vorliegenden Arbeit konnte eine deutliche Reduktion der mRNA-Expression des antiapoptotischen bcl- x_L durch Dehnung beobachtet werden (vgl. Abb. 38 C). Auch bei der terminalen Herzinsuffizienz ist bcl- x_L im humanen Myokard deutlich herabreguliert und normalisiert sich wieder unter hämodynamischer Ent-

lastung (Bartling *et al.*, 1999). Eine mechanische Belastung von isolierten Kardiomyozyten bewirkt eine Änderung des Verhältnisses zwischen pro- und antiapoptotischen Mitgliedern dieser Familie zugunsten der Apoptoseauslösung (Leri *et al.*, 1998). Bcl- x_L wird demnach mechanosensitiv im Myokard reguliert und ist somit an der Auslösung von Apoptose durch Dehnung beteiligt.

Untersuchungen zur mRNA-Expression des Apoptose auslösenden Fas-Rezeptors in den Kaninchentrabekeln zeigten keine Veränderungen (vgl. Abb. 38 B), so daß eine Induktion von Fas bei der Auslösung von Apoptose in diesen gedehnten Trabekeln keine Rolle spielt. Im Gegensatz dazu wurde bei der extremen Überdehnung von Papillarmuskeln der Ratte eine verstärkte Expression von Fas in den Kardiomyozyten beobachtet (Cheng *et al.*, 1995), die allerdings später vom Seniorautor mündlich widerrufen wurde.

Das Modell multizellulärer Myokardtrabekel ist also zur Analyse einer Überlast-induzierbaren Myokardapopotose geeignet. Der entscheidende Vorteil des Trabekelsystems gegenüber Zellkulturen ist, daß die Kardiomyozyten keinen aufwendigen Vereinzelungsmechanismen ausgesetzt werden müssen und somit ursprüngliche Kontakte und Verankerungen der Zellen im Gewebe erhalten bleiben. In solch einem Herzmuskelpräparat konnte zum ersten mal gezeigt werden, daß durch chronische Überlast (Dehnung) in einem klinisch relevanten Bereich Apoptose von Kardiomyozyten induziert werden kann. Eine Limitierung des Modells ist jedoch das extrem geringe Probenvolumen, das die Analyse nur weniger Komponenten erlaubt. Daher wurde auch bei den Expressionsuntersuchungen von ANP, Fas und bcl- x_L eine semiquantitative RT-PCR mit Normalisierung auf GAP-DH bevorzugt. Die Größe der Trabekel ist aber auch ein bedeutender Faktor, denn durch die Verwendung wesentlich größerer Muskelstreifen (Papillarmuskeln), wären Schädigungen der inneren Zellen durch Mangelversorgung oder Hypoxie nicht auszuschließen.

Der entscheidende Vorteil des Systems aber ist die physiologische und biochemische Stabilität der Trabekel über 48 h, die Experimente zur Manipulationen bestimmter Zielgene erlaubt. Die Präparate können nach Entnahme des Herzens mit hoher Effizienz mit rekombinanten Adenoviren durch Langendorff-Perfussion transfiziert werden (Lehnart *et al.*, 2000). Als nächster Schritt sind daher Experimente geplant, die eine dehnungsabhänige Apoptose in den Trabekeln verhindern, wie beispielsweise die Überexpression des antiapoptotischen bcl-x_L.

Als Kritikpunkt muß jedoch angemerkt werden, daß das Trabekelmodell auch eine gewisse Variabilität in der Apoptosehäufigkeit in sich birgt und auch in der ANP-Expression einige Unklarheiten erkennen läßt. Kardiomyozyten reagieren auf Dehnung mit der schnellen Induktion bzw. Freisetzung von ANP (Knowlton, 1992). Dabei wiesen jedoch die Kontrolltrabekel bereits eine erhöhte ANP-Expression auf. Möglicherweise führten schon eine geringfügige mechanische Beanspruchung der Trabekel bei der Präparation zu einer Erhöhung der ANP-Expression, die durch Dehnung über 48 h im Muskelbad nicht weiter anstieg. Zum anderen könnten aber auch durch das Befestigen in der Apparatur oder beim Herausnehmen der Trabekel die Expression induziert werden und somit die erhöhte ANP-Expression in den ungedehnten Trabekeln (Abb. 38 A) erklären.

Mit dem System kultivierter Kaninchentrabekel konnte erfolgreich Apoptose in Kardiomyozyten in Abhängigkeit von mechanischer Überlast-induziert werden. Ein Unterschied dieses Systems zur Situation *in vivo* besteht jedoch darin, daß sich bei der Kontraktion während der Auswurfphase die Sarkomeren des Muskels verkürzen. In unserem Modell hingegen ist nur eine isometrische Kontraktion möglich, bei der die Länge der Sarkomeren gleichbleibt und die zu einem Anstieg der Nachlast führt. Leider ist es derzeit technisch nicht möglich Muskelpräparate so wie im *in vivo* schlagenden Herzen während der Auswurfphase zu "entlasten".

Durch gezielte Expressionsanalysen wurden im humanen Myokard mit terminaler Herzinsuffizienz Phänotypveränderungen im Vergleich zum Spendermyokard gefunden, die möglicherweise zu einer erhöhten Anfälligkeit der überlasteten Kardiomyozyten gegen Apoptose im Verlauf der Krankheit beitragen. Die dargestellten Veränderungen im Bereich der Apoptose auslösenden "death domain"-Rezeptoren könnten als diagnostische Indikatoren in Myokardbiopsien Anwendung finden, ebenso der leicht durchzuführende apoptotische DNA-Leiterscore zur Abschätzung der Apoptosehäufigkeit. Vergleichende Untersuchungen am überlasteten und entlasteten Myokard zeigten eine deutliche Tendenz zur teilweisen Reversibilität der Insuffizienz, so daß der Einsatz von ventrikulären Überbrückungssystemen und die damit verbundene mechanische Entlastung des Herzens schon als frühere therapeutische Maßnahme begründet werden kann. Diese Reversibilität der proapoptotischen Myokardveränderungen durch mechanische Herzentlastung ist eine wesentliche Stütze für die Hypothese, daß es im Myokard eine mechanosensitive Apoptoseregulation gibt. Dies wird weiterhin durch Befunde an dem der in vivo-Situation recht ähnlichen Modell der in vitro-Kultivierung und Dehnung ganzer Muskelstreifen deutlich. Mechanische Dehnung wurde als ein entscheidender Stimulus bei der Auslösung von Apoptose in Kardiomyozyten identifiziert. Es bieten sich nun Experimente in diesem Trabekelsystem an, die durch gezielte Genmanipulation in die Apoptoseauslösung protektiv eingreifen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Aufgrund des histologischen Nachweises von Kernapoptose in Kardiomyozyten in insuffizienten, explantierten Patientenherzen wird vermutet, daß vermehrt auftretende apoptotische Myozytenverluste im Spätstadium der Herzinsuffizienz eine Ursache für den progredienten Verlauf der Erkrankung sein könnte. Bisher sind aber Mechanismen der Apoptoseinduktion im überlasteten Herzen noch ungeklärt. Dies erschwert die Entwicklung von Präventionsstrategien gegen die Progression von Herzinsuffizienz.

Es wurde deshalb untersucht, ob krankheitsbedingte Überdehnung des Herzens in Patienten zu Phänotypveränderungen des Myokards im Sinne einer erhöhten Apoptoseanfälligkeit führen kann und ob diese Veränderungen reversibel sind. Diese Untersuchungen erfolgten in humanen Myokardproben, die bei Herzoperationen, bei Herztransplantationen sowie nach chirurgischer Entlastung überdehnter Herzen entnommen worden waren. In diesen Proben wurde eine quantitative Charakterisierung von Komponenten der apoptotischen Signalwege vorgenommen, die von sogenannten "Todes"-Rezeptoren aktiviert werden können.

Zudem wurde ein *in vitro*-Modell entwickelt, in dem überprüft werden sollte, ob Dehnung in einem klinisch relevanten Ausmaß tatsächlich zu Apoptose im kontrahierenden Myokard führt. Dieses Modell wies nach mehrtägiger Kultivierung noch genügend mechanische und biochemische Stabilität auf, so daß damit Transfektionsexperimente zur funktionellen Kennzeichnung der Signalwege der mechanosensitiven Apoptose geplant werden können. Da kultivierte Kardiomyozyten wegen der Auflösung ursprünglicher Zellkontakte und Verankerungen eine erheblich veränderte Regulation der Apoptose aufweisen, wurde dazu ein Kultivierungsmodell von Mikrotrabekeln aus intaktem Myokardgewebe des Kaninchens genutzt.

Eine erhöhte Apoptosehäufigkeit in den untersuchten Proben terminal insuffizienten Myokards konnte durch die Quantifizierung der apoptotischen DNA-Fragmentierung in einem apoptotischen DNA-Leiterscore bestätigt werden.

Im insuffizienten humanen Myokard wurden Phänotypveränderungen, die zu einer erhöhten Apoptoseanfälligkeit der Kardiomyozyten beitragen können, im System der Apoptose induzierenden "Todes"-Rezeptoren und ihrer Liganden Fas und TRAIL gefunden.

Der Fas-Ligand war im terminal insuffizienten Myokard deutlich gegenüber dem Spendermyokard erhöht. Bei der Expression seines Rezeptors Fas wurden herzkammerspezifische Veränderungen beobachtet. Während die mRNA von Fas im rechten Atrium von Patienten mit höherem Schweregrad der Herzinsuffizienz auf das 2 - 3fache im Vergleich zu Patienten mit einem geringeren Schweregrad erhöht war, konnten im linken Ventrikel keine Unterschiede in der mRNA-Expression von Fas zwischen Spender- und terminal insuffizientem Myokard gefunden werden. Jedoch wurde eine erhöhte Expression alternativ gespleißter Fas-Transkripte für antiapoptotische, lösliche Fas-Isoformen im Spendermyokard nachgewiesen, die im terminal insuffizienten linken Ventrikel signifikant herabreguliert waren.

Die Proteinexpression des Apoptose induzierenden Liganden TRAIL war bei Herzinsuffizienz signifikant auf etwa das Doppelte erhöht, während die mRNA-Expression der TRAIL-Rezeptoren keinen Veränderungen hinsichtlich einer erhöhten Apoptoseanfälligkeit unterlag. In nachgeschalteten Molekülen des Signalweges der "Todes"-Rezeptoren wurden keine Veränderungen beobachtet.

Die chirurgische chronische Entlastung von überdehnten Herzen durch ein implantiertes Kunstherz (ventricular assist device, VAD) bewirkte eine leichte Renormalisierung des Phänotyps hinsichtlich der mRNA-Expression der Fas-Isoform FasExo6Del und auch der Apoptosehäufigkeit.

Im Modell der Kultivierung intakter Kaninchentrabekel konnte gezeigt werden, daß Apoptose durch graduierte Belastung im physiologisch relevanten Bereich ohne hormonelle Einflüsse in Kardiomyozyten induzierbar ist. Einhergehend mit der erhöhten Apoptose wurde eine signifikante Herabregulation des antiapoptotischen $bcl-x_L$ beobachtet.

Die Untersuchungen ergaben, daß chronische Myokardüberdehnung im erkrankten Patientenherzen zu Phänotypveränderungen in Richtung auf eine erhöhte Apoptoseanfälligkeit führt und dies durch Herzentlastung teilweise reversibel ist. Experimente am isolierten Myokard zeigten, daß mechanische Dehnung der entscheidende Apoptoseinduktor ist. Dies könnte bedeuten, daß die Entlastung des insuffizienten Myokards von Patienten durch VAD, welches ursprünglich zur Überbrückung bis zur Transplantation entwickelt wurde, als therapeutische Maßnahme zur Behandlung von Herzinsuffizienz eingesetzt werden könnte.

7 LITERATUR

Adams, J. M., Cory, S. (1998). The bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. Science **281**, 1322-1326.

Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. D., Wong, W.W., Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. Cell 87, 171.

Anderson, P. A. W., Greig, A., Mark, T. M., Malouf, N. N., Oakeley, A. E., Ungerleider, R. M., Allen, P. D., B.K., K. (1995). Molecular basis of human cardiac troponinT isoforms expressed in the developing, adult, and failing heart. Circ Res **76**, 681-686.

Anversa, P., Olivetti, G., Leri, A., Liu, Y., Kajstura, J. (1997). Myocyte cell death and ventricular remodeling. Curr Opin Nephrol Hypertension.

Arends, M. J., Morris, R. G., Wyllie, A. H. (1990). Apoptosis: the role of endonuclease. Am J Pathol **136**, 593-608.

Ashkenazi, A., Dixit, V. M. (1998). Death receptors: Signaling and modulation. Science **281**, 1305-1308.

Bartling, B., Holtz, J., Darmer, D. (1998). Contribution of myocyte apoptosis to myocardial infarction? Basic Res Cardiol **93**, 71-84.

Bartling, B., Milting, H., Schumann, H., Darmer, D., Arusoglu, L., Mörner, M. M., El-Banayosy, A., Körfer, R., Holtz, J., Zerkowski, H.-R. (1999). 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 (Suppl. II) **100**, 216-223.

Bazzoni, F., Beutler, B. (1996). The tumor necrosis factor ligand and receptor families. N Engl J Med **334**, 1717-1725.

Beltrami, C. A., Finato, N., Rocco, M., Feruglio, G. A., Puricelli, C., Cigola, E., Sonnenblick, E.H., Olivetti, G., Anversa, P. (1995). The cellular basis of dilated cardiomyopathy in humans. JMoll Cardiol 27, 291-305.

Bennet, M., Macdonald, K., Chan, S.-W., Luzio, J. P., Simari, R., Weissberg, P. (1998). Cell surface Trafficking of Fas: A rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. Science **282**, 290-293.

Bing, O. H. L. (1994). Hypothesis: apoptosis may be a mechanism for the transition of heart failure with chronic pressure overload. J Mol Cell Cardiol **26**, 943-948.

Boise, L. H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., Mao, X., Nunez, G., Thompson, C. B. (1993). *bcl-x*, a *bcl-2*-related gene that function as a dominant regulator of apoptotic cell death. Cell **74**, 597-608.

Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsey, Y. V., Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1 and TNF receptor-induced cell death. Cell **85**, 803-815.

Boldin, P., Varfolomeev, E. E., Chumakov, I., Shemer-Avni, Y., Camonis, J. H., Wallach, D. (1995). A novel protein that interacts with the death domain of FAS/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. J Biol Chem **270**, 7795-7798.

Bozkurt, B., Knibbs, S. B., Clubb, F. J., Michael, L. H., Didenko, V. V., Hornsby, P. J., Seta, Y., Oral, H., Spinale, F. G., Mann, D. L. (1998). Pathophysiologically relevant concentrations of Tumor Necrosis Factor-a promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. Circulation **97**, 1382-1391.

Breitbart, R. E., Andreadis, A., Nadal-Ginard, B. (1987). Alternative splicing: Ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. Ann Rev Biochem **56**, 467-495.

Bursch, W., Kleine, L., Tenniswood, M. (1990). The biochemistry of cell death by apoptosis. Am J Pathol **68**, 1071-1074.

Cascino, I., Fiucci, G., Papoff, G., Ruberti, G. (1995). Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. J Immunol **154**, 2706-2713.

Cascino, I., Papoff, G., Eramo, A., Ruperti, G. (1996). Soluble Fas/Apo-1 splicing variants and apoptosis. Front Biosci 1, d12-18.

Chaudhary, P. M., Eby, M., Jasmin, A., Bookwalker, A., Murray, J., Hood, L. (1997). Death receptor 5, a new member of TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kB pathway. Immunity **7**, 821-830.

Cheng, J., Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J. P., Brauer, M. J., Kiefer, M. C., Barr, P. J., Mountz, J. D. (1994). Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. Science **263**, 1759-1762.

Cheng, W., Li, B., Kajstura, J., Li, P., Wolin, M. S., Sonnenblick, E. H., Hinze, T. H. (1995). Stretch-induced programmed myocyte cell death. J Clin Invest **96**, 2247-2259.

Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., Dixit, V. M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. Cell **81**, 505-512.

Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Yu, G.-L., Lyons, R. H., Garg, M., Duan, R., Xing, L., Gentz, R., Ni, J., Pan, G., Dixit, V. M. (1996). Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. Science **274**, 990-992.

Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., Rutter, W. J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid isolated from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry **18**, 5294-5299.

Chui, L. P., Cohen, S. H., Morris, D. W., Jordan, G. W. (1992). Intracellular amplification of proviral DNA in tissue sections using the polymerase chain reaction. J Histochem Cytochem 40, 333-341.

Clem, R. J., Cheng, E. H.-Y., Karp, C. L., Kisch, D. G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M. B., Griffin, D. E., Earnshaw, W. C., Veliuona, M. A., Hardwick, J. M. (1998). Modulation of cell death by Bcl-xL through caspase interaction. Proc Natl Acad Acad Sci USA **95**, 554-559.

Colucci, W. S. (1996). Apoptosis in the heart. N Engl J Med 335, 1224-1226.

Colucci, W. S. (1997). Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure. Am. J. Cardiol. **80**, 15L-25L.

Criteria Comittee NewYork Heart Association (1964). Diseases of the heart and blood vessels. Nomenclature and criteria for diagnosis, 6th edn. Little Brown & Co. Boston, 114.

Curtiss, C., J.N., C., Vrobel, T., Franciosa, J. A. (1978). Role of the renin-angiotensin system in the systemic vasoconstriction of chronic congestive heart failure. Circulation **58**, 763-770.

Darmer, D., Bartling, B., Holtz, J. (2000). Apoptosis in heart failure - reversible? Z Kardiol, (in press).

De Wegner, R., De Jonge, N., Bruggnik, A., Van Wichen, D., Leemans, J., Bijlsma, F., Gmelig-Meyling, F. (1999). Is the human heart an immune privileged site? (Abstrakt). Eur Cytokine Network **10**, 447.

Didenko, V. V., Hornsby, P. J. (1996). Presence of double-stranded breaks with single-base 3' overhangs in cells undergoing apoptosis but not necrosis. J. Cell Biol. **135**, 1369-1376.

Earnshaw, W. C. (1999). A cellular poison cupboard. Nature 397, 387-389.

Engelmann, H., Aderka, D., Rubinstein, M., Rotman, D., Wallach, D. A. (1989). Tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from from tumor necrosis factor toxicity. J Biol Chem **264**, 11974-11980.

Eschenhagen, T., Weil, J. (1998). Molekulare Grundlagen der Herzinsuffizienz. In: Handbuch der Molekularen Medizin, Ganten, D. und K. Ruckpaul, eds. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Felzen, B., Shilkrut, M., Less, H., Sarapov, I., Maor, G., Coleman, R., Robinson, R. B., Berke, G., Binah, O. (1998). Fas (CD95/Apo-1)-mediated damage to ventricular myocytes induced by cytotoxic T lymphocytes from perforin-deficient mice: a major role for Inositol 1, 4, 5-Triphosphate. Circ Res **82**, 438-450.

Ferrari, R., Bachetti, T., Confortini, R., Opasich, C., Febo, O., Corti, A., Cassani, G., Visioli, O. (1995). Tumor necrosis factor soluble receptors in patients with various degrees of congestive heart failure. Circulation **92**, 1479-1486.

Förster, E. (1994). An improved general method to generate internal standards for competitive PCR. BioTechniques 16, 18-20.

Franke, T. F., L.C., C. (1997). A Bad kinases makes good. Nature 390, 116-117.

Frankfurt, O. S., Robb, J. A., Sugarbaker, E. V., Villa, L. (1996). Monoclonal antibody to singlestranded DNA is a specific and sensitive cellular marker of apoptosis. Exp. Cell Res. **226**, 387-397.

Frazier, O. H., Rose, E. A., McCarthy, P., Burton, N. A., Tector, A., Levin, H. R., H.L., K. (1995). Improved mortality and rehabilitation of transplant candidates treated with long-term implantable left ventricular assist device. Ann Surg **222**, 327-338.

Freude, B., Masters, T. N., Kostin, S., Robicsek, F., Schaper, J. (1998). Cardiomyocyte apoptosis in acute and chronic conditions. Bas Res Cardiol **93**, 85-89.

Frisch, S. M., Rouslahti, E. (1997). Integrins and anoikis. Curr Opin Cell Biol 9, 701-706.

Gavrieli, Y., Shermann, Y., Ben-Sasson, S. A.-Y. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J. Cell Biol. **119**, 493-501.

Ge, H., Manley, J. (1991). Primary structure of the human splicing factor ASF reveals similarities with *Drosophila* splicing regulators. Cell **66**, 373-382.
Goldstein, D. J., Oz, M. C., Rose, E. A. (1998). Implantable left ventricular assist devices. N Engl J Med **339**, 1522-1533.

Gottlieb, R. A., Burleson, K. O., Kloner, R. A., Babior, B. M., Engler, R. L. (1994). Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. J Clin Invest **94**, 1621-1628.

Green, D. R., Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. Science 281, 1309-1312.

Grunstein, R., Belland, S. E., Jeevanandam, V., Eisen, H. J. (1997). The Effect of Sustained Mechanical Support on Myocardial Apoptosis in Patients with Severe Dilated Cardiomyopathy (Abstrakt). Circulation (Suppl. I) **96**, I-372.

Guerra, S., Leri, A., Wang, X., Finato, N., Di Loreto, C., Beltrami, C. A., Kajstura, J., Anversa, P. (1999). Myocyte death in failing human is gender dependent. Circ Res **85**, 856-866.

Gura, T. (1997). How TRAIL kills cancer cells, but not normal cells. Science 277, 768-768.

Han, D. K. M., Chaudhary, P. M., Wright, M. E., Friedmann, C., Trask, B. J., Riedel, R. T., Baskin, D. G., Schwartz, S. M., Hood, L. (1997). MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. Proc Natl Acad Sci USA **94**, 11333-11338.

Haunstetter, A., Izumo, S. (1998). Apoptosis: Basic mechanism and implications for cardiovascular disease. Circ Res **82**, 1111-1129.

Heinrich, H., Schumann, H., Holtz, J. (1999). Long-term ANP elevation in rats: no induction of myocardial apoptosis via the ANP-cGMP axis (Abstrakt). Eur Cytokine Network 10, 447.

Hellige, G. (1996). Koronare Herzkrankheit von A bis Z. 2. Aufl., Medikon Verlag, München.

Hengartner, M. O. (1998). Death cycle and swiss army knives. Nature 391, 441-442.

Hetts, S. W. (1998). To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. JAMA

279, 300-307.

Hoffen, E. (1998). Mechanisms of human heart allograft rejection. the role of T cells, macrophages and cytokines, Universität Utrecht, Utrecht.

Holtz, J. (1992). Bedeutung der Myokardhypertrophie bei Herzinsuffizienz. Z Kardiol 81, 41-48.

Holtz, J. (1993). Myokardhypertrophie nach Myokardinfarkt: Welche Bedeutung haben die Phänotypveränderungen der Kardiozyten? Herz **18**, 387-394.

Hsu, H., Xiong, J., Goeddel, D. V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kB activation. Cell **81**, 495-504.

Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Fesik, S. W. (1996). NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. Nature **384**, 638-641.

Irmler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schröter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L. E., Tschopp, J. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. Nature **388**, 190-195.

Itoh, N., Nagata, S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. J Biol Chem 268, 10932-10937.

Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S. I., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., Nagata, S. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. Cell **66**, 233-243.

James, T. N. (1994). Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart from postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias. Circulation **90**, 556-587.

Janssen, P., Zeitz, O., Hasenfuss, G. (1999). Transient and sutained impacts of hydroxyl radicals on sarcoplasmic reticulum function: protective effects of nebivolol. Eur J Pharmacol **366**, 223-232.

Janssen, P. M. L., Hunter, W. C. (1995). Force, not sarcomere length, correlates with prolongation of isosarcometric contraction. Am J Physiol **269**, H676-H685.

Janssen, P. M. L., Lehnart, S. E., Prestle, J., Lynker, J. C., Salfeld, P., Just, H., Hasenfuss, G. (1998). The trabecula culture system: a novel technique to study contractile parameter over a multiday period. Am J Phys (Heart Circ Physiol 43) **274**, H1481-H1488.

Jeremias, I., Kupatt, C., Martin, V., A., Habazettl, H., Schenkel, J., Boekstegers, P., Debatin, K. M. (2000). Involvement of CD95L, TRAIL, and TNFa in apoptotic cell death following myocardial infarction. Circ Res, (in press).

Kajstura, J., Cheng, W., Reiss, K., Clark, W. A., Sonnenblick, E. H., Krajewski, S., Reed, J. C., Olivetti, G., Anversa, P. (1996). Apoptotic and necrotic myocyte cell death are independent contributing variables of infarct size in rats. Lab Invest **74**, 86-107.

Kajstura, J., Cheng, W., Sarangarajan, R., Li, P., Nitahara, J. A., Chapnick, S., Reiss, K., Olivetti, G., Anversa, P. (1996). Necrotic and apoptotic cell death in the aging hearts of Fischer 344 rats. Am J Physiol **271**.

Kajstura, J., Cigola, E., Malhotra, A., Li, P., Cheng, W., Meggs, L. G., Anversa, P. (1997). Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. J Mol Cell Cardiol **29**, 859-870.

Kajstura, J., Leri, A., Finato, N., Di Loreto, C., Beltrami, C. A., Anversa, P. (1998). Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. Proc Natl Acad Sci USA **95**, 8801-8805.

Kajstura, J., Mansukhani, M., Cheng, W., Reiss, K., Krajewski, S., Reed, J. C., Qiani, F., Sonnenblick, E. H., Anversa, P. (1995). Programmed cell death and expression of the protooncogen bcl-2 in myocytes during postnatal maturation of the heart. Exp Cell Res **219**, 110-121.

Kanoh, M., Takemura, G., Misao, J., Hayakawa, Y., Aoyama, T., Nishigaki, K., Noda, T., Fujiwara, T., Fukuda, K., Minatoguchi, S., Fujiwara, H. (1999). Significance of myocytes with positive in situ nick end-labeling (TUNTEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair. Circulation **99**, 2757-2764. Katz, A. M. (1990). Cardiomyopathy of overload: a major determinant of prognosis in congestive heart failure. N Engl J Med **322**, 100-110.

Kitson, J., Raven, T., Jiang, Y.-P., Goeddel, D. V., Giles, K. M., Pun, K.-T., Grinham, C. J., Brown, R., Farrow, S. N. (1996). A death domain containing receptor that mediates apoptosis. Nature **384**, 372-375.

Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R., Newmeyer, D. D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. Science **275**, 1132-1136.

Knipping, E., Debatin, K.-M., Sticker, K., Heilig, B., Eder, A., Krammer, P. H. (1995). Identification of soluble APO-1 in supernatants of human B- and T-cell lines and increased serum Levels in B- and T-cell leukemias. Blood **85**, 1562-1569.

Knowlton, K. U. (1992). Atrial natriuretic factor: a molecular marker for cardiac specific, embryonic and inducible gene expression. Heart Failure **8**, 121-128.

Köhler, T., Laßner, D., Rost, A.-K., Thamm, B., Pustowoit, R., Remke, H. (1995). Quantitation of mRNA by Polymerase Chain Reaction: nonradioactive PCR methods, Springer-Verlag, Berlin.

Krainer, A., Conway, G., Kozak, D. (1990). Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells. Genes Dev **4**, 1158-1171.

Kroemer, G. (1997). The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis: The mechanism of action of Bcl-2 provides clues for therapeutic interventions. Nature Medicin **3**, 614-620.

Krown, K. A., Page, M. T., Nguyen, C., Zechner, D., Gutierrez, V., Comstock, K. L., Glembotski, C. C., Quintana, P. J. E., Sabbadini, R. A. (1996). Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes: Involvement of the spingolipid signaling cascade in cardiac cell death. J Clin Invest **98**, 2854-2865.

Kumar, S., Colussi, P. A. (1999). Prodomains-adaptors-oligomerization: the pursuit of caspase

activation in apoptosis. TIBS 24, 1-4.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**, 680-685.

Lehnart, S. E., P.M.L., J., Franz, W. M., Donahue, J. K., J.H., L., Marban, E., Prestle, J., Hasenfuss, G. (2000). Preservation of myocardial function after adenoviral gene transfer. AJP, (in press).

Leri, A., Claudio, P. P., Li, Q., Wang, X., Reiss, K., Wang, S., Malhotra, A., Kajstura, J., Anversa, P. (1998). Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apotosis by activating p53 that enhances the local Renin-Angiotensin system and decreases Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. J Clin Invest **101**, 1326-1342.

Leri, A., Liu, Y., Claudio, P. P., Kajstura, J., Wang, X., Wang, S., Kang, P., Malhotra, A., Anversa, P. (1999). 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**, 567-580.

Levine, H. R., Oz, M. C., Chen, J. M., Packer, M., Rose, E. A., Burkhoff, D. (1995). Reversal of chronic ventricular dilation in patients with endstage cardiomyopathy by prolonged mechanical offloading. Circulation **91**, 2717-2720.

Levine, T. B., Francis, G. S., Goldsmith, S. R., Simon, A. B., Cohn, J. N. (1982). Activity of the sympathetic nervous system assessed by plasma hormone levels and their relation to hemody-namic abnormalities in congestive heart failure. Am J Cardiol **49**, 1659-1666.

Li, P., Nijhwan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., Wang, X. (1997). Cytochrome c and ATP-dependent formation of Apaf-1/Caspase-9 complex initiates an apoptotic caspase cascade. Cell **91**, 479-489.

Li, Q., Li, B., Wang, X., Leri, A., Jana, K. P., Liu, X., Kajstura, J., Baserga, R., Anversa, P. (1997). Overexpression of insulin growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress and cardiac hypertrophy. J Clin Invest **100**,

1991-1999.

Li, Z., Bing, O. H. L., Long, X., Robinson, K. G., Lakatta, E. G. (1997). Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontanously hypertensive rat. Am J Physiol **272**, H2313-H2319.

Liu, C., Cheng, J., Mountz, J. D. (1995). Differential expression of human Fas mRNA species upon peripheral blood mononuclear cell activation. Biochem J **310**, 957-963.

Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, W. (1996). Induction of apoptotic program in cell free extracts: requirement dATP and cytochrome c. Cell **86**, 147-157.

Liu, Y., Cigola, E., Cheng, W., Kajstura, J., Olivetti, G., Hintze, T. H., Anversa, P. (1995). Myocyte nuclear mitotic division and programmed myocyte cell death characterize the cardiac myopathy induced by rapid ventricular pacing in dogs. Lab Invest **73**, 771-786.

Liu, Z.-G., Hsu, H., Goeddel, D., Karin, M. (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kB activation prevents cell death. Cell **87**, 565-576.

Loebe, M., Müller, J., Hetzer, R. (1999). Ventricular assistance for recovery of cardiac failure. Curr Opin Cardiol **14**, 234-248.

Loebe, M., Weng, Y., Müller, J., Dandel, M., Halfmann, R., Spiegelsberger, S., Hetzer, R. (1997). Successful mechanical circulatory support for more than two years with a left ventricular assist device in a patient with dilated cardiomyopathy. J Heart Lung Transplant **16**, 1176-1179.

MacFarlane, M., Ahmad, M., Srinivasaula, S. M., Fernandes-Alnemri, T., Cohen, G. M., Alnemri, E. S. (1997). Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. J Biol Chem **272**, 25417-25420.

Mann, D. L., Urabe, Y., Kent, R. L., Vinciguerra, S., Cooper, G. I. V. (1991). Cellular versus myocardial basis for the contractile dysfunction of hypertrophied myocardium. Circ Res **68**, 402-415.

Mann, D. L., Willerson, J. T. (1998). Left ventricular assist devices and the failing heart: a bridge to recovery, a permanent assist device, or a bridge too far? Circulation **98**, 2367-2369.

Marchetti, P., Castedo, M., Susin, S. A., Zamzami, N., Hirsch, T., Macho, A., Haeffner, A., Hirsch, F., Geuskens, M., Kroemer, G. (1996). Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. J Exp Med **184**, 1155-1160.

Mariani, S. M., Krammer, P. H. (1998). Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. Eur J Immunol **28**, 973-982.

Mariani, S. M., Matiba, B., Armandola, E. A., Krammer, P. H. (1997). Interleukin 1 betaconverting enzyme related proteases/caspases are involved in TRAIL-induced apoptosis of myeloma and leukemia cells. J Cell Biol **137**, 221-229.

Marsters, S. A., Pitti, R. M., Donahue, C. J., Ruppert, S., Bauer, K. D., Ashkenazi, A. (1996). Activation of apoptosis by Apo-2 ligand is independent of FADD but blocked by CrmA. Curr Biol **6**, 750-752.

Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Donahue, C. J., Pitti, R. M., Gray, C. L., Goddard, A. D., Bauer, K. D., Ashkenazi, A. (1996). APO-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains death domain and activates apoptosis and NF-kB. Curr Biol **6**, 1669-1676.

Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Pitti, R. M., Brush, J., Goddard, A., Ashkenazi, A. (1998). Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor apo3. Curr Biol **8**,525-528.

McBride, L. R., Naunheim, K. S., Fiore, A. C., Moroney, D. A., Swartz, M. T. (1999). Clinical experience with 111 thoratec ventricular assist devices. Ann Thorac Surg **67**, 1233-1239.

Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death inducing signaling complex (DISC). EMBO J **16**, 2794-2804.

Meredith, J. E., Schwartz, M. A. (1997). Integrins, adhesion and apoptosis. Trends Cell Biol 7, 146-150.

Mesnard, L., Logeart, D., Taviaux, S., Diriong, S., Mercadier, J.-J., Samson, F. (1995). Human cardiac troponinT: cloning and expression of new isoforms in the normal and failing heart. Circ Res **76**, 687-692.

Miyashita, T., Reed, J. C. (1995). Tumor suppresser p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. Cell **80**, 294-299.

Müller, J., Wallukat, G., Weng, Y. G., Dandel, M., Spiegelsberger, S., Semrau, S., Brandes, K., Theodoridis, V., Loebe, M., Meyer, R., Hetzer, R. (1997). Weaning from mechanical cardiac support in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. Circulation **96**, 542-549.

Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death inducing signaling complex. Cell **85**, 817-827.

Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. Cell 88, 355-365.

Nagata, S., Goldstein, P. (1995). The Fas death factor. Science 267, 1449-.

Narula, J., Haider, N., Virmani, R., DiSalvo, T. G., Kolodgie, F. D., Hajjar, R. J., Schmidt, U., Semigran, M. J., Dec, G. W., Khaw, B., A, (1996). Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. N Engl J Med **335**, 1182-1189.

Narula, J., Pandey, P., Arbustini, E., Haider, N., Narula, N., Kolodgie, F. D., Dal Bello, B., Semigran, M. J., Bielsa-Masdeu, A., Dec, G. W., Israels, S., Ballester, M., Virmani, R., Saxena, S., Kharbanda, S. (1999). Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from motichondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. Proc Natl Acad Sci USA **96**, 8144-8149.

Nicholson, D. W., Thornberry, N. A. (1997). Caspases: killer proteases. TIBS 22, 299-306.

Nishigaki, K., Minatoguchi, S., Asano, K., Takatsu, H., Noda, T., Sano, H., Yasuda, N. (1998). Prognosis with severe heart failure is differently better in a group with high plasma soluble Fas, an inhibitor of apoptosis (Abstract). Circulation **98**.

Nishigaki, K., Minatoguchi, S., Seishima, M., Asano, K., Noda, T., Yasuda, N., Sano, H., Kumada, H., Takemura, M., Noma, A., Tanaka, T., Watanabe, S., Fujiwara, H. (1997). Plasma Fas ligand, and inducer of apoptosis, and plasma soluble Fas, an inhibitor of apoptosis, in patients with chronic congestive heart failure. JACC **29**, 1214-1220.

Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, B. C., Ponstingl, H., Krammer, P. H. (1992). Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. J Biol Chem **267**, 10709-10715.

Okuyama, M., Yamaguchi, S., Nozaki, N., Yamaoka, M., Shirakabe, M., Tomoike, H. (1997). Serum levels of soluble form of Fas molecule in patients with congestive heart failure. Am J Cardiol **79**, 1698-1701.

Olivetti, G., Abbi, R., Quiani, F., Kajstura, J., Cheng, W., Nitahara, J. A., Quiani, E., Di Loreto, C., C.A., B., Krajewski, S., C., R. J., Anversa, P. (1997). Apoptosis in the failing human heart. N Engl J Med **336**, 1131-1141.

Pan, G., Bauer, J. H., Haridas, V., Wang, S., Liu, D., Yu, G., Vincenz, C., Aggarwal, B. B., Ni, J., Dixit, V. M. (1998). Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. FEBS Lett 431, 351-356.

Pan, G., Ni, J., Wei, Y.-F., Yu, G.-I., Gentz, R., Dixit, V. M. (1997). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. Science **277**.

Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A. M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., Dixit, V. M. (1997). The receptor of the cytotoxic ligand TRAIL. Science **276**, 111-113.

Papoff, G., Cascino, I., Eramo, A., Starace, G., Lynch, D. H., Ruberti, G. (1996). An N-terminal

domain shared by Fas/Apo-1 (CD95) soluble variants prevents cell death in vitro. J Immunol **156**, 4622-4630.

Papoff, G., Hausler, P., Eramo, A., Pagano, M. G., Di Leve, G., Signore, A., Ruberti, G. (1999). Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95. J Biol Chem **274**, 38241-38250.

Pennica, D., Nedwin, G. E., Hayflick, J. S., Seeburg, P. H., Derynck, R., Palladino, M. A., Kohr,W. J., Aggarwal, B. B., Goeddel, D. V. (1984). Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. Nature, 724-729.

Peters, J., Krams, M., Wacker, H. H., Carstens, A., Weisner, D., Hamann, K., Menke, M., Harms, D., Parwaresch, R. (1997). Detection of rare RNA sequences by single enzyme *in situ* reverse transcription-polymerase chain reaction: high-resolution analyses of interleukin-6 mRNA in paraffin sections of lymph nodes. Am J Pathol **150**, 469-476.

Pitti, R. M., Marsters, S. A., Lawrence, D. A., Roy, M., Kischkel, F. C., Dowd, P., Huang, A., Donahue, C. J., Sherwood, S. W., Baldwin, D. T., Godowski, P. J., Wood, W. I., Gurney, A. L., Hillan, K. J., Cohen, R. L., Goddard, A. D., Botstein, D., Ashkenazi, A. (1998). Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. Nature **396**, 699-703.

Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A., Ashkenazi, A. (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. J Biol Chem **271**, 12687-12690.

Polyak, K., Xia, Y., Zeier, J. L., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1997). A model for p53-induced apoptosis. Nature **389**, 300-305.

Quiani, F., Cigola, E., Lagrasta, C., Saccani, G., Quiani, E., Rossi, C., Olivetti, G., Anversa, P. (1994). End-stage cardiac failure in humans is coupled with the induction of proliferating cell nuclear antigen and nuclear mitotic division in ventricular myocytes. Circ Res **75**, 1050-1063.

Rasper, D. M., Vaillancourt, J. P., Hadano, S., Houtzager, V. M., Seiden, I., Keen, S. L. C., Tawa, P., Xanthoudakis, S., Nasir, J., Martindale, D., Koop, B. F., Peterson, E. P., Thornberry,

N. A., Huang, J., Macpherson, D. P., Black, S. C., Hornung, F., Lenardo, M. J., Hayden, M. R., Roy, S., Nicholson, D. W. (1998). Cell death attenuation by "Usurpin", a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. Cell Death Diff **5**, 271-288.

Reed, J. C. (1997). Double identity for proteins of the Bcl-2 family. Nature 387, 773-776.

Ruiz-Opazo, N., Nadal-Ginard, B. (1987). Alpha-tropomyosin gene organization: alternative splicing of duplicated isoform-specific exons accounts for the production of smooth and striated muscle isoforms. J Biol Chem **262**, 4755-4765.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sanger, F., Nickeler, S., A.R., C. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74, 5463-6567.

Saraste, A., Pulkki, K., Kallajoki, M., Heikkila, P., Laine, P., Mattila, S., Nieminen, M. S., Parvinen, M., Voipio-Pulkki, L. M. (1999). Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation. Eur J Clin Invest **29**, 380-386.

Schaper, J., Elsässer, A., Kostin, S. (1999). The role of cell death in heart failure. Circ Res 85, 867-869.

Schaper, J., Lorenz-Meyer, S., Suzuki, T. (1999). The role of apoptosis in dilated cardiomyopathy. Herz **24**, 219-224.

Schellenberger, E., Szibor, M., Holtz, J. (2000). In vivo imaging of apoptosis in overload induced heart failure: potential approaches in application implications. Z Kardiol, (in press).

Schneider, P., Bodmer, J. L., Thome, M., Holler, N., Hofmann, K., Tschopp, J. (1997). Characterization of two receptors binding TRAIL. FEBS Letters **416**, 329-334.

Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., Peter, M. E. (1998). Apoptosis signal-

ing by death receptors. Eur J Biochem 254, 439-459.

Screaton, G., Caceres, J., Mayeda, A., Bell, M., Plebanski, M., Jackson, D., Bell, J., Krainer, A. (1995). Identification and characterization of three members of the human SR family of premRNA splicing factors. EBMO J 14, 4336-4349.

Screaton, G. R., Monkolsapaya, J., Xu, X. N., Cowper, A. E., McMichael, A. J., Bell, J. I. (1997). TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. Curr Biol 7, 693-696.

Screaton, G. R., Xu, X. N., Olsen, A. L., Cowper, A. E., Tan, R., McMicheael, A. J., Bell, J. I. (1997). LARD: A new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing. Proc Natl Acad Sci USA **94**, 4615-4619.

Shaham, S., Horvitz, H. (1996). An alternatively spliced C. elegans ced-4 RNA encodes a novel cell death inhibitor. Cell **86**, 201-208.

Sharov, V. G., Sabbah, H. N., Shimoyama, H., Goussev, A. V., Lesch, M., Goldstein, S. (1996). Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure. Am J Pathol **148**, 141-149.

Sheridan, J. P., Marsters, S. A., Pitti, R. M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C. L., Baker, K., Wood, W. I., Goddard, A. D., Godowsky, P., Ashkenazi, A. (1997). Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. Science **277**.

Silbernagel, S., Despopoulos, A. (1991). Taschenatlas der Physiologie. 4. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Smith, C. A., Farrah, T., Goodwin, R. G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation. costimulation, and death. Cell **76**, 959-962.

Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes Alnemri, T., Litwack, G., Alnemri, E. S. (1996). Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA- inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 14486-14491.

Stevenson, L. W. (1998). Inotropic therapy for heart failure. N Engl J Med 339, 1848-185.

Suda, T., Nagata, S. (1994). Purification and characterization of the Fas ligand that induces apoptosis. J Exp Med **179**, 873-879.

Suda, T., Takahashi, T., Goldstein, P., Nagata, S. (1993). Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. Cell **75**, 1169-1178.

Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Brener, C., Larochette, N., Prevost, M.-C., Alzari, P. M., Kroemer, G. (1999). Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. J Exp Med **189**, 381-393.

Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M., Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis.inducing factor. Nature **397**, 441-446.

Susin, S. A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M., Kroemer, G. (1996). Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. J Exp Med **184**, 1331-1341.

Tanaka, M., Ito, H., Adachi, S., Akimoto, H., Nishikawa, T., Kasajima, T., Marumo, F., Hiroe, M. (1994). Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. Circ Res **75**, 426-433.

Tanaka, M., Suda, T., Takahashi, T., Nagata, S. (1995). Expression of the functional soluble form of the human Fas ligand in activated lymphocytes. EMBO J 14, 1129-1135.

Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H., Goeddel, D. V. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. Cell **74**, 845-853.

Tartaglia, L. A., Goeddel, D. V. (1992). Two TNF receptors. Immunol Today 13, 151-153.

Teiger, E., Dam, T. V., Richard, L., Wisnewski, C., Tea, B. S., Gaboury, L., Tremblay, J., Schwartz, K., Hamet, P. (1996). Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. J Clin Invest **97**, 2891-2897.

The Consensus Trial Study Group (1987). Effect of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). N Engl J Med **316**, 1429-1435.

The SOLVD Investigators (1991). Effect of elanapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fraction and congestive heart failure. N Engl J Med **325**, 293-302.

Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinl, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J. L., Schroter, M., Scaffidi, C., Krammer, P. H., Peter, M. E., Tschopp, J. (1997). Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. Nature **386**, 517-521.

Thornberry, N. A., Lazebnil, Y. (1998). Caspases: Enemies within. Science 281, 1312-1316.

Ting, A. T., Pimentel Muinos, F. X., Seed, B. (1996). RIP mediates tumor necrosis factor 1 activation of NF-*k*B but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. EMBO J **15**, 6189-6196.

Torre-Amione, G., Kapadia, S., Lee, J., Bies, R. D., Lebovitz, R., Mann, D. L. (1995). Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium. Circulation **92**, 1487-1493.

Torre-Amione, G., Kapadia, S., Lee, J., Durand, J. B., Bies, R. D., Young, J. B., Mann, D. L. (1996). Tumor necrosis factor-a and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. Circulation **93**, 704-711.

Toyozaki, T., Hiroe, M., Tanaka, M., Nagata, S., Ohwada, H., Marumo, F. (1998). Levels of

soluble Fas ligand in myocarditis. Am J Cardiol 82, 246-248.

Tschopp, J., Irmler, M., Thome, M. (1998). Inhibition of Fas death signals by FLIPs. Curr Opin Immunol **10**, 552-558.

Utz, P. J., Hottelet, M., van Venrooij, W. J., Anderson, P. (1998). Association of phosphorylated serine/arginine (SR) splicing factors with the U1-small ribonucleoprotein (snRNP) autoantigen complex accompanies apoptotic cell death. J Exp Med **187**, 547-560.

Valcarcel, J., Green, M. R. (1996). The SR protein family: pleiitropic functions in pre-mRNA splicing. TIBS **21**, 296-301.

Vaux, D. L. (1997). CED-4 - the third horseman of apoptosis. Cell 90, 389-390.

Villa, P., Kaufmann, S. H., Earnshaw, W. C. (1997). Caspases and caspases inhibitors. TIBS 22, 388-393.

Walczak, H., Degli-Esposti, M. A., Johnson, R. S., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Boiani, N., Timour, M. S., Gerhart, M. J., Schooley, K. A., Smith, C. A., Goodwin, R. G., Rauch, C. T. (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. EMBO J **16**, 5386-5397.

Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Nagata, S. (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas iántigen that mediates apoptosis. Nature **356**, 314-317.

Westaby, S., Coats, A. J. S. (1998). Mechanjical bridge to myocardial recovery. Eur Heart J 19, 541-547.

Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G.R., Davis Smith, T., Rauch, C., Smith, C.A., Goodwin (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. Immunity 3,673-682.

Willerson, J. T., Cohn, J. N. (1995). Cardiovascular Medicine. Churchill Livingstone, New York.

Wu, C. F., Bishopric, N. H., Pratt, R. E. (1997). Atrial natriuretic peptide induces apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes. J Biol Chem **272**, 14860-14866.

Wyllie, A. H., Morris, R. G., Smith, A. L., Dunlop, D. (1984). Chromatin cleavage in apoptosis: association with condesed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. J Pathol **142**, 67-77.

Yamaguchi, S., Yamaoka, M., Okuyama, M., Nitoube, J., Shirakabe, M., Shirakawa, K., Nakamura, N., Tomoike, H. (1999). Elevated circulating Levels and cardiac secretion of soluble Fas ligand in patients with congestive heart failure. Am J Cardiol **83**, 1500-1503.

Yue, T. L., Ma, X. L., Wang, X., Romanic, A. M., Liu, G. L., Louden, C., Gu, J. L., Kumar, S., Poste, G., Ruffolo, R. R. J., Feuerstein, G. Z. (1998). Possible involvement of stress-activated protein kinase signaling pathway and Fas receptor expression in prevention of ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis by carvedilol. Circ Res **82**, 166-174.

Yusuf, S., Pepine, C. J., Garces, C., Pouleur, H., Salem, D., Kostis, J., Benedict, C., Rousseau, M., Bourassa, M., Pitt, P. (1992). Effect of Elanapril on myocardial infarction and unstable angina in patients with low ejection fraction. Lancet **340**, 1173-1178.

Zafeiridis, A., Houser, S. R., Mattielo, J. A., Jeevanandam, V., Margulies, K. B. (1997). LVAD support produces "reverse remodeling" of cardiac myocytes (Abstract). Circulation (Suppl I) **96**, I-603.

Zahler, A. M., Neugebauer, K. M., Lane, W. S., Roth, M. B. (1993). Distinct functions of SR proteins in alternative pre-mRNA splicing. Science **260**, 219-222.

ANHANG

Patient	NYHA	Diastole	Systole	Alter	m/w	Operation	ACE-I.	Fas	DNA-LS		
								[amol/µg RNA]	[rel. Units/µg DNA]		
RA 1	1	kA.	kA.	1	W	SD	-	2.020	nd.		
RA 2	1	kA.	kA.	62	W	ACVB	-	0.753	0.000		
RA 3	1	kA.	kA.	40	m	VC	-	0.886	0.010		
RA 4	1	120	63	16	W	SD	-	1.291	0.128		
RA 5	1	150	91	74	m	ACVB	+	0.265	nd.		
RA 6	1	kA.	kA.	29	W	SD	-	0.692	nd.		
RA 7	1	122	60	17	W	SD	-	1.426	nd.		
RA 8	1	kA.	kA.	40	m	Spender	-	0.798	nd.		
RA 8	1	86	50	66	W	VC	-	0.942	nd.		
RA 9	1	108	67	16	m	SD	-	0.792	nd.		
RA 10	1	kA.	kA.	44	W	Myxom	-	1.585	nd.		
RA 11	2	125	80	51	m	ACVB	-	1.906	nd.		
RA 12	2	kA.	kA.	68	m	ACVB	+	1.906	nd.		
RA 13	2	140	80	75	m	ACVB	-	1.446	nd.		
RA 14	2	115	60	56	m	VC	-	1.318	nd.		
RA 15	2	150	80	59	m	ACVB	+	1.200	0.000		
RA 16	2	140	70	59	W	ACVB	+	0.764	nd.		
RA 17	2	110	60	66	m	VC	-	1.446	nd.		
RA 18	2	100	58	59	m	VC	-	3.312	nd.		
RA 19	3.5	120	70	59	W	VC, KE	-	2.755	nd.		
RA 20	3.5	140	80	51	m	VC, KE	-	3.021	nd.		
RA 21	3.5	150	80	67	m	ACVB	+	3.021	nd.		
RA 22	3.5	160	90	65	W	ACVB	-	3.021	nd.		
RA 23	3.5	125	85	73	W	VC	-	1.446	0.000		
RA 24	3.5	110	70	36	W	ACVB	-	2.090	0.000		
RA 25	3.5	150	85	63	m	ACVB	-	2.755	0.000		
RA 26	3.5	120	75	55	W	ACVB, VC	+	1.906	0.049		
RA 27	3.5	90	60	61	m	ACVB	+	1.000	0.000		
RA 28	3.5	140	90	56	m	ACVB	+	0.638	0.015		
RA 29	3.5	120	70	46	m	ACVB	+	1.318	nd.		
RA 30	3.5	140	70	55	m	ACVB	-	2.499	nd.		
RA 31	3.5	126	58	68	m	ACVB	+	1.740	nd.		
RA 32	3.5	130	80	51	m	ACVB	+	1.000	0.019		
RA 33	3.5	122	70	73	m	ACVB	+	0.912	0.000		

RA 34	3.5	130	70	64	W	ACVB	-	0.576	0.025		
RA 35	3.5	120	80	76	W	VC	-	0.521	nd.		
RA 36	3.5	130	80	66	m	ACVB	-	0.759	0.021		
RA 37	3.5	140	70	75	W	ACVB	-	0.838	nd.		
RA 38	3.5	130	75	59	m	ACVB	+	1.325	nd.		
RA 39	3.5	kA.	kA.	63	m	ACVB	-	1.318	nd.		
RA 40	3.5	100	65	48	m	ACVB	-	1.086	0.009		
RA 41	3.5	118	63	59	m	ACVB, VC	-	0.916	nd.		
RA 42	3.5	92	46	74	m	ACVB, VC	-	1.768	nd.		
RA 43	3.5	162	67	71	m	ACVB	+	3.223	nd.		
RA 44	3.5	130	61	68	m	VC	-	1.200	nd.		
RA 45	4	110	70	63	m	ACVB	+	1.296	nd.		
RA 46	4	130	90	63	m	ACVB	-	1.097	0.000		
RA 48	4	120	90	63	m	ACVB	-	1.920	nd.		
RA 49	4	140	50	71	m	ACVB, VC	+	3.021	0.120		
RA 50	4	180	70	77	m	ACVB	+	1.584	0.000		
RA 51	4	110	56	63	m	VC	+	2.601	nd.		
RA 52	4	80	50	59	m	ACVB	-	2.078	0.000		
RA 53	4	92	53	52	m	ACVB	+	1.318	nd.		
RA 54	4	140	62	73	m	ACVB	+	1.318	nd.		
RA 55	4	97	65	65	m	ACVB	-	3.619	nd.		
RA 56	4	146	88	76	W	ACVB	+	3.515	nd.		
RA 57	4	109	47	72	m	ACVB	-	2.505	nd.		

Tab. A 1: Zusammenfassung der Daten der Patienten, bei denen Untersuchungen am rechten
Herzohr (RA) durchgeführt wurden. m = männlich, w = weiblich, DNA-LS = apoptotischer DNA-
Leiterscore, kA. = keine Angaben, nd. = nicht definiert, ACVB = Aortokoronarer Venöser Bypass, SD =
Septumdefekt, KE = Klappenersatz, VC = Klappenkorrektur.

Patient	NYHA	Diagnose	EF	ACE	Alter	m/w	DNA-LS	Fas	sFas	Ratio	DR4	DR5	DcR1	TRAIL	TRAIL-	FasL	TNF-RI	TRADD	FADD	Caspase-8	FLIPL	FLIPs
				-I.											Protein							
			[%]				[rel. Ein-	[amol/µg	[amol/µg		[amol/µg	[amol/µg	[amol/µg	[amol/µg	[rel.							
							heiten/µg	gesamt	gesamt		gesamt	gesamt	gesamt	gesamt	Einheiten]							
							DNA]	RNA]	RNA]		RNA]	RNA]	RNA]	RNA]								
D 1	-				45	m	0.0000	0.46	0.46	1.00	0.5	3.6	0.1	493.0	4.59	0.292	0.713	0.679	0.793	0.867	0.620	0.474
D 2	-				23	m	0.0000	0.66	0.28	2.37	0.59	5.3	0.1	339.5	3.51	nd.						
D 3	-				29	W	0.0090	1.10	1.56	0.70	nd.	nd.	nd.	nd.	3.66	0.369	0.747	1.018	0.602	0.889	0.723	0.559
D 4	-				36	m	0.0110	nd.	nd.	nd.	1.1	21.14	0.16	376	12.49	nd.						
D 5	-				44	m	0.0140	nd.	nd.	nd.	0.52	6.8	0.08	528.5	5.36	nd.						
D 6	-				26	W	0.0140	0.70	0.32	2.17	nd.	nd.	nd.	nd.	3.86	0.350	0.569	0.949	0.617	0.781	0.714	0.592
D 7	-				43	m	0.0259	nd.	nd.	nd.	1.34	5.3	0.15	771.2	5.97	nd.						
D 8	-				10	w	0.0336	1.36	0.67	2.02	1.78	142.4	0.51	431.0	8.17	nd.						
D 9	-				30	m	0.0531	1.26	0.80	1.58	0.83	13.3	0.09	349.4	4.49	0.301	0.633	0.950	0.608	0.846	0.780	0.602
D 10	-				52	m	nd.	0.87	0.80	1.10	0.62	18.33	0.11	531.0	9.67	0.307	0.593	0.746	0.607	0.783	0.641	0.492
D 11	-				56	m	nd.	0.66	0.96	0.69	0.5	7.46	0.15	428.2	nd.	0.227	0.569	0.801	0.658	0.731	0.651	0.471
D 12	-				30	m	nd.	nd.	nd.	nd.	2.18	11.67	0.16	742.0	nd.							
LV 1	4	DCM	27	-	43	W	0.0504	nd	nd	nd	0.52	2.4	0.45	118.3	5.54	nd.						
LV 2	kA.	DCM	38	+	58	W	0.0000	nd	nd	nd	0.6	4.8	0.84	103.3	14.93	nd.						
LV 3	kA.	DCM	30	+	53	m	0.0120	0.80	0.19	4.27	0.48	3.1	0.3	48.0	nd.							
LV 4	kA.	DCM	36	+	58	m	0.0175	1.26	0.27	4.74	0.9	0.8	0.2	218.0	15.34	nd.						
LV 5	3	DCM	17	+	63	m	0.0175	1.38	0.35	3.92	0.76	2	0.24	118.3	8.15	nd.						
LV 6	4	DCM	kA.	+	53	m	0.0245	0.66	0.13	4.98	1.1	6	0.25	376.2	nd.	0.681	0.604	0.727	0.755	0.950	0.689	0.490
LV 7	4	DCM	15	+	56	m	0.0290	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
LV 8	4	DCM	kA.	+	57	m	0.0290	1.52	0.31	4.98	0.48	4.2	0.34	135.3	9.56	0.740	0.634	0.962	0.659	0.867	0.613	0.419
LV 9	4	DCM	22	+	32	m	0.0290	0.60	0.12	5.03	0.48	3.3	0.39	90.1	7.39	0.514	0.527	0.887	0.540	0.792	0.554	0.420
LV 10	4	DCM	20	+	35	W	0.0303	0.96	0.23	4.12	0.96	7.2	0.22	306.6	nd.	0.579	0.587	0.700	0.657	0.884	0.672	0.540
LV 11	4	DCM	27	+	64	m	0.0320	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
LV 12	4	DCM	37	+	64	m	0.0440	2.00	0.72	2.77	1.53	5.52	0.55	998.5	6.69	nd.						
LV 13	2.5	DCM	28	+	58	W	0.0460	0.73	0.13	5.75	0.46	7.95	0.18	97.3	nd.	0.233	0.560	0.805	0.596	0.805	0.607	0.526
LV 14	4	DCM	30	+	58	m	0.0473	0.60	0.17	3.55	1.26	6	0.11	375.9	nd.	0.438	0.570	0.887	0.630	0.888	0.692	0.565
			~																			

LV 15	3.5	DCM	kA.	+	50	m	0.0590	nd	nd	nd	0.23	1.18	0.22	188.4	17.54	nd.						
LV 16	kA.	DCM	kA.	+	55	m	nd.	1.82	0.47	3.84	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
LV 17	4	DCM	kA.	+	55	m	nd.	0.73	0.25	2.88	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
LV 18	4	DCM	11	+	38	m	nd	nd	nd	nd	0.48	4.8	0.11	103.3	11.25	nd.						
LV 19	3	КНК	39	-	54	m	0.0145	1.82	0.45	4.07	1.78	10.8	0.06	218.3	17.94	nd.						
LV 20	3.5	КНК	18	-	49	m	0.0410	1.05	0.15	6.86	0.52	8.6	0.24	402.7	13.20	0.563	0.547	0.803	0.576	0.888	0.669	0.533
LV 21	4	КНК	18	-	56	m	0.0550	1.15	0.32	3.61	1.35	11.6	0.63	135.0	14.03	0.353	0.571	0.881	0.789	0.826	0.677	0.569
LV 22	3	КНК	30	-	54	m	0.0810	1.66	0.47	3.55	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
LV 23	4	КНК	kA.	-	62	m	0.0880	0.96	0.31	3.06	0.56	4.7	0.19	88.3	19.23	0.249	0.546	0.794	0.592	0.745	0.704	0.416
LV 24	3.5	КНК	20	-	53	m	nd.	0.55	0.33	1.69	0.88	1.32	0.13	203.9	5.75	nd.						
LV 25	2.5	КНК	35	-	62	m	nd.	0.66	0.15	4.53	0.74	12.7	0.11	203.9	nd.							
LV 26	2.5	КНК	25	-	52	m	nd.	0.60	0.12	5.03	0.56	3.2	0.11	87.1	nd.							
LV 27	3.5	КНК	kA.	+	60	m	0.0380	2.00	0.50	3.99	1.31	21.8	0.25	207.1	19.15	0.299	0.613	0.925	0.528	0.829	0.675	0.585
LV 28	3	КНК	40	+	52	m	0.0440	2.00	0.55	3.66	1.52	2.4	0.27	103.3	10.58	0.283	0.575	0.978	0.600	0.829	0.681	0.449
LV 29	kA.	КНК	kA.	+	50	m	0.0450	nd.	nd.	nd.	2.04	10	0.14	306.8	10.01	nd.						
LV 30	3.5	КНК	16	+	66	m	0.0615	1.15	0.15	7.52	0.5	2.8	0.34	267.8	8.87	0.376	0.623	0.928	0.639	0.863	0.700	0.462
LV 31	4	КНК	20	+	54	m	0.3210	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.						
LV 32	2.5	КНК	14	+	47	m	nd.	1.82	0.26	7.00	1.45	6.8	0.1	178.0	nd.							

Tab. A 2: Zusammenfassung der Daten der Patienten, bei denen Untersuchungen am linken Ventrikel (LV) durchgeführt wurden. sFas = FasExo6Del, Ratio = Verhältnis Fas/FasExo6Del, DNA-LS = apoptotischer DNA-Leiterscore, m = männlich, w = weiblich, kA. = keine Angaben, nd. = nicht definiert.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die mich auf diesem langen Weg positiv beeinflußt haben:

Als erstes gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. J. Holtz für die Überlassung des Dissertationsthemas, die intensive Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft und das Interesse am Verlauf der Arbeiten.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. D. Darmer für die optimale Betreuung der molekularbiologischen Arbeiten und vor allem für ihre konstruktiven Vorschläge und Anregungen, die zum Fortschreiten der Arbeiten wesentlich beigetragen haben.

Ganz besonders möchte ich den Mitarbeitern der Herz- und Thoraxchirurgie des Klinikums Kröllwitz unter der (damaligen) Leitung von Prof. Dr. H.-R. Zerkowski für die ständige gute Zusammenarbeit danken.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Hasenfuß der Universität Göttingen, speziell Herrn Dr. P. Janssen danke ich für die erfolgreiche Durchführung der Experimente zum Trabekel-System und die intensive Diskussion der Ergebnisse.

Frau Dr. U. Müller-Werdan danke ich für die Bereitstellung neonataler Rattenkardiomyozyten.

Frau Bauer gilt mein Dank für die Herstellung von Paraffinschnitten, sowie Frau Beyer für die Möglichkeit der Nutzung des Gefriermikrotoms.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. H. Morawietz, Herrn U. Rückschloß, Herrn A. Schubert, Herrn E. Schellenberger und Frau B. Bartling für die sehr gute Zusammenarbeit im Labor.

Ein spezieller Dank gilt den technischen Mitarbeiter/innen der Pathophysiologie Frau R. Unterfranz, Frau E. Heinke, Frau B. Heinze, Frau R. Gall sowie Herrn R. Busath, der mir bei der statistischen Auswertung und graphischen Darstellung der Ergebnisse stets behilflich war.

Besonders möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Zentralen Arbeitsgruppe, die mich im letzten Jahr sehr unterstützt haben, danken.

Ganz herzlich danke ich meiner Familie, Freunden und speziell M. Tostlebe für alle Geduld, Verständnis, Hilfe und das Interesse an der Arbeit.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, bei der Anfertigung der vorliegenden Dissertation nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben und aus benutzten Werken entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht zu haben.

Hile blumann

Heike Schumann

Halle, 05. März 2000

LEBENSLAUF

Name:	Heike Schumann										
Geburtstag:	09. Dezember 1970										
Geburtstort:	Schmölln										
09/77 - 08/87	Polytechnische Oberschule in Runsdorf und Gößnitz										
	Abschlußzeugnis 10. Klasse										
09/87 - 08/89	Erweiterte Oberschule in Schmölln										
	Abschluß: Abitur										
09/89 - 02/95	Biochemie-Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg										
	Diplomprüfung in den Fächern Biochemie, Organische Chemie,										
	Mikrobiologie und Gentechnik										
	Diplomarbeit am Institut für Allgemeine und Pflanzenbiochemie zum										
	Thema "Klonierung genomischer Sequenzen der intrazellulären RNase LX										
	aus Tomate"										
03/95 - 12/98	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pathophysiologie der										
	Universität Halle										
04/97	Oskar-Lapp-Preis der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Herz- und										
	Kreislaufforschung										
seit 01/99	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Zentralen Arbeitsgruppe der										
	Medizinischen Fakultät der Universität Halle										

Halle, 05. März 2000 Heile Klumann

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

Schumann H, Morawietz H, Hakim K, Zerkowski HR, Eschenhagen T, Holtz J, Darmer D (1997) Alternative splicing of the primary Fas transcript generating soluble Fas antagonists is supressed in the failing human ventricular myocardium. Biochem Biophys Res Comm **239**: 794-798.

Milting H, Bartling B, Schumann H, El-Banayosy A, Wlost S, Rüter F, Darmer D, Holtz J, Körfer R, Zerkowski H-R (1999) Altered levels of mRNA of Apoptosis-modulating genes after mid-term mechanical ventricular support in dilative cardiomyopathy - first results of the Halle Assist Induced Recovery study (HAIR). Thorac Cardiovasc Surg **47**: 48-50.

Bartling B, Milting H, Schumann H, Darmer D, Arusoglu L, Kürner MM, El-Banayosy A, Körfer R, Holtz J, Zerkowski HR (1999) Myocardial gene expression of regulators of myocyte apoptosis and myocyte calcium homoestasis during hemodynamic unloading by ventricular assist devices in patients with endstage heart failure. Circulation (Suppl II) **100**: 216-223.

Janssen PML, Hassenfuss G, Zeitz O, Lehnart SE, Darmer D, Holtz J, Schumann H (1999) Loaddependent induction of apoptosis in multicellular myocardial preparations (Abstrakt). Circulation (Suppl I) **100**: 4002.

Übersichtsartikel:

Schumann H, Heinrich H, Bartling B, Darmer D, Holtz J (2000): Apoptosis in the overloaded myocardium: potential stimuli and modifying signals. In: From molecule to men: molecular basis of congenital cardiovascular disorders; Zehender M, Breitbart G, Just H, (eds.), Steinkopff-Verlag, Darmstadt, 33-68.