

**Aus der Universitätsklinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie
Tübingen**

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. U. Stock

**Untersuchungen zum Calciumstoffwechsel an humanem
Myokard in einer Mikroperfusionskammer**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Mirjam Renovanz

aus

Biberach a.d. Riß

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Aebert

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Beyer

I. INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
1.1 Physiologie und Pathophysiologie von Calcium in Kardiomyozyten	1
1.1.1 Sarkolemmaler Calcium-Fluss	2
1.1.2 Calcium-Fluss im sarkoplasmatischen Retikulum	3
1.1.3 Calcium-vermittelte Signale in Kardiomyozyten	5
1.1.4 Der β_1 -Rezeptor und seine Rolle bei der Apoptose	8
1.1.5 Calcium-overload und Apoptose	9
1.2 Apoptose	9
1.2.1 Physiologische Bedeutung der Apoptose	10
1.2.2 Ablauf der Apoptose auf molekularer Ebene	10
1.3 Apoptose in Kardiomyozyten, Stand der Forschung	11
1.3.1 Molekularer Ablauf	11
1.3.2 Mechanismen und Stimuli	16
1.4 Ziele dieser Arbeit	17
2 MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Material	18
2.1.1 Gewebeproben	18
2.1.2 Chemikalien	19
2.2 Methoden	23
2.2.1 Entnahme von humanem Herzgewebe	23
2.2.2 Präparation der Resektate	23
2.2.3 Bestimmung der Zellvitalität	23
2.2.4 Versuchsreihen zur Inkubation von Kardiomyozytenverbänden	25
2.2.5 Beschreibung des Mikroperfusionssystems	27
2.2.6 Beschreibung des Perfusions- und Begasungssystems	29
2.2.7 Beschreibung der Messapparatur	32
2.2.8 Ratiometrische Auswertung der Fluoreszenzintensität	34
2.2.9 Untersuchung der intrazellulären Calcium-Regulation an Kardiomyozytenzellverbänden	34
2.2.10 Simultane Calcium-Messung während Kardioplegiegabe, Hypoxie und Reperfusion	36
2.2.11 Anfertigung der Kryoschnitte	39
2.2.12 Färbung der Kryoschnitte mit Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP)	39
2.2.13 Fotodokumentation	39
2.2.14 Statistik	40
3 ERGEBNISSE	41
3.1 Morphologie der Zellverbände	41

3.2 Vitalitätsnachweis und Auswahl von geeigneten Zellverbänden	41
3.2.1 Vitalitätsnachweis mit Fura-2 AM	41
3.2.2 Vitalitätsnachweis mit der Trypanblau-Methode	42
3.2.3 Optimale Inkubation der Zellverbände	43
3.3 Grundlagenversuche	43
3.4 Simultane Calcium-Messung während Kardioplegiegabe, Hypoxie und Reperfusion	44
3.4.1 Ergebnisse der Calcium-Messung	44
3.4.2 Apoptose-Detektion mittels PARP-Färbung	49
4 DISKUSSION	55
4.1 Kardiomyozytenzellverband in vitro	55
4.2 Vitalität der Zellverbände	56
4.3 Inkubation mit Fura-2 AM	57
4.4 Die Mikroperfusionskammer - Untersuchungsmethode für Kardiomyozyten im Zellverband	57
4.4.1 Grundlagen der Ca-Regulationsmechanismen der KMZ	58
4.4.2 Temperatur-abhängige Beeinflussung der Calcium-Homöostase	59
4.5 Korrelation zwischen Calcium-Ratioveränderungen und Apoptose-Rate bei der PARP-Färbung	60
4.6 Schlussfolgerung	63
5 ZUSAMMENFASSUNG	66
6 LITERATUR	69
7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	87
8 DANKSAGUNG	90
9 LEBENS LAUF	91

1 EINLEITUNG

Bei offenen Herzoperationen wird mit Hilfe einer Kardioplegielösung durch elektromechanische Entkopplung ein künstlicher Herzstillstand hervorgerufen und eine Kardioprotektion erreicht. Währenddessen ermöglicht die extrakorporale Zirkulation durch die Herz-Lungen-Maschine eine Aufrechterhaltung des Blutkreislaufs.

In der anschließenden Reperfusionphase bis zum Wiedereinsetzen einer suffizienten kardialen Auswurfleistung können Schäden im Herzmuskel auftreten. In Vorarbeiten an isolierten Kardiomyozyten konnte bereits gezeigt werden, dass der Schaden am Herzmuskel nach Hypoxie und Reperfusion durch z. B. zytosolischen Calcium-Anstieg, freie Sauerstoffradikale und durch anschließende Apoptose zustande kommt (*Schmitt et al., 2002; Hotta et al., 2001; Pang et al., 2002; Schafer et al., 2001; Wasser et al., 1997; Tanneur et al., 2002; Cesselli et al., 2001; Chesley et al., 2000; de Moissac et al., 2000; Kang et al., 2000; Freude et al., 2000; Holleymann et al., 2001*).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein dem originären Gewebe kongruentes humanes Myokardmodell etabliert, mit dem die intrazellulären Calciumregulationsmechanismen und ihre Rolle beim Reperfusionsschaden bzw. der Apoptoseinduktion untersucht wurden. Eine Methode mit einer Mikroperfusionskammer nach Weinlich et al. (2002) bot die Möglichkeit, Verhältnisse wie bei der extrakorporalen Zirkulation während einer Operation mit Kardioplegiegabe, Hypoxie und Reperfusionphase zu simulieren, um deren Auswirkung auf die Vitalität und Funktion der humanen Kardiomyozyten in vitro zu untersuchen.

1.1 Physiologie und Pathophysiologie von Calcium in Kardiomyozyten

Das Calcium-Ion und der Calciumstoffwechsel spielen für die kontraktile Funktion des gesunden Myokards eine zentrale Rolle.

Im Herzen gibt es zwei Calciumspeicher, die zur Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration während der Systole beitragen: die extrazelluläre Matrix und das sarkoplasmatische Retikulum.

Die extrazelluläre Calcium-Konzentration beträgt 10^{-3} M bis 2×10^{-3} M, in der ruhenden Herzmuskelzelle hingegen 10^{-7} M, dort kann sie aber während der Systole auf über 10^{-5} M ansteigen. Außerdem sind insgesamt 99,9% des Calciums während der Diastole gebunden bzw. in intrazellulären Organellen gespeichert. Im Folgenden sollen die Transportmechanismen der Kardiomyozyten für das Calcium und die funktionelle Bedeutung des sarkoplasmatischen Retikulums als Calcium-Speicher beschrieben werden (*Blinks JR et al., 1986; Carafoli et al., 1985*).

1.1.1 Sarkolemmaler Calcium-Fluss

Die sarkolemmale Membran der Kardiomyozyten ist durch Einfaltungen, so genannte T-Tubuli, welche tief in die Myozyten hineinreichen, stark vergrößert. In dieser Membran sind verschiedene Ionenkanäle und Pumpen zur Regulierung der zellulären Integrität und der Calcium-Homöostase integriert.

Der Einstrom von Calcium in die Zelle kann über spannungsabhängige Calcium-Kanäle und den sarkolemmalen Natrium/Calcium-Austauscher (NCX) erfolgen. Durch Depolarisierung der Zellmembran wird der transsarkolemmale Calcium-Einstrom aktiviert und anschließend durch die Änderung des Membranpotentials und die erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration wieder deaktiviert. Während des Aktionspotentials ist hauptsächlich der spannungsabhängige Calcium-Kanal vom L-Typ für den Calcium-Einstrom in die Zelle verantwortlich. Dieser Kanal kann von intrazellulärer Seite aus durch eine bestimmte Calcium-Konzentration (negativer Rückkopplungsmechanismus) oder über β -adrenerge Stimulation (positiver Wirkmechanismus durch Phosphorylierung) moduliert werden (*Janczewski et al., 1993; Hess et al., 1983*).

Der sarkolemmale Natrium/Calcium-Austauscher (NCX) kann je nach elektrochemischen Gradienten von Natrium und Calcium und Membranpotential der Zelle ein Calcium-Ion gegen zwei Natrium-Ionen entweder nach intrazellulär oder extrazellulär transportieren, wobei er indirekt von der Natrium/Kalium-ATPase angetrieben wird. Große Mengen ATP und das Vorliegen einer Alkalo-

se stimulieren den NCX von extrazellulär, Azidose inhibiert ihn. Von intrazellulär wird der NCX von Calcium aktiviert und von Natrium sekundär inhibiert (*Bers 1993; Bers 1991; Terraccino et al., 1994; Hilgemann et al., 1992; Lewitzky et al., 1994; Matsouka et al., 1995*).

Die sarkolemmale Calcium-ATPase ist das dritte wichtige Transportsystem. Sie besitzt eine hohe Calcium-Affinität und pumpt Calcium unter direktem Energieverbrauch aus der Zelle (*Caroni et al., 1980*). Da diese Pumpe langsam arbeitet, ist sie eher für die langfristige Calcium-Regulation als für die Calcium-Regulation innerhalb eines Kontraktionszyklus von Bedeutung.

1.1.2 Calcium-Fluss im sarkoplasmatischen Retikulum

Das sarkoplasmatische Retikulum ist neben den Mitochondrien (Adenosintri-phosphat-Produktion) das wichtigste Organell des Kardiomyozyten. Es besteht aus longitudinalen (L)-Tubuli sowie terminalen Zisternen, welche mit den sarkolemmalen T-Tubuli in Verbindung stehen. Speicherung und Freisetzung von Calcium sind die Hauptfunktionen dieses Organells und es besitzt in seinem Inneren die calcium-bindenden Proteine Calsequestrin und Calreticulin.

In der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums befinden sich Ryanodin-Rezeptoren (RyR2) und die sarkoendoplasmatische Retikulum Calcium-ATPase (SERCA), die beide für die Regulierung des Calcium-Flusses zuständig sind. Die Ryanodin-Rezeptoren sind Calcium-Freisetzungskanäle (*Nimer et al., 1995*) und befinden sich hauptsächlich in den terminalen Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums (*Lewis et al., 1995*). Sie können von einigen Faktoren beeinflusst werden, z. B. wird der Kanal durch submikromolare Konzentrationen an Calcium und Koffein aktiviert, wohingegen ATP den Kanal nur dann aktivieren kann, wenn gleichzeitig eine bestimmte intrazelluläre Calcium-Konzentration vorhanden ist. Zudem kann das Inhalationsnarkotikum Halothan Ryanodin-Rezeptoren aktivieren. Im Gegensatz hierzu wird der Rezeptor von Substanzen wie Magnesium, Ruthenium Rot, Ryanodin und durch Stoffwechselsituationen wie Azidose gehemmt (*Bers DM, 1991*).

Die sarkoendoplasmatische Calcium-ATPase (SERCA) bzw. die herzspezifische Isoform SERCA-2a ist hauptsächlich in den L-Tubuli des sarkoplasmatischen Retikulums zu finden. Diese Pumpe transportiert unter Verbrauch von

einem Molekül ATP zwei Calcium-Ionen vom Zytoplasma ins sarkoplasmatische Retikulum. Die SERCA stellt so den Hauptmechanismus für die Entfernung des erhöhten intrazellulären Calciums dar (*Hasenfuss et al., 1994; Schatzmann, 1989*). Sie wird von Phospholamban, einem Regulatorprotein inhibiert. Dieser inhibitorische Effekt auf die SERCA wird durch cAMP-abhängige oder Calcium-Calmodulin-abhängige Phosphorylierung (via Proteinkinase) aufgehoben (*Karczewsky et al., 1997*). Folglich wird die Calcium-Aufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum gesteigert. Azidose verringert die Pumpleistung, Alkalose erhöht sie. Ein pharmakologischer Hemmstoff der SERCA ist z. B. Thapsigargin.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil zur Calciumhomöostase ist die Permeability Transition Pore (PTP). Diese ist eine in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte Öffnung und ermöglicht einen Calcium-Ausstrom aus dem Mitochondrium. Eine irreversible Öffnung der PTP und damit einhergehende mitochondriale Dysfunktion scheint aufgrund verschiedener pathologischer Mechanismen eine Schlüsselfunktion bei Apoptose und Zelltod einzunehmen (*Selivanov et al., 1998*).

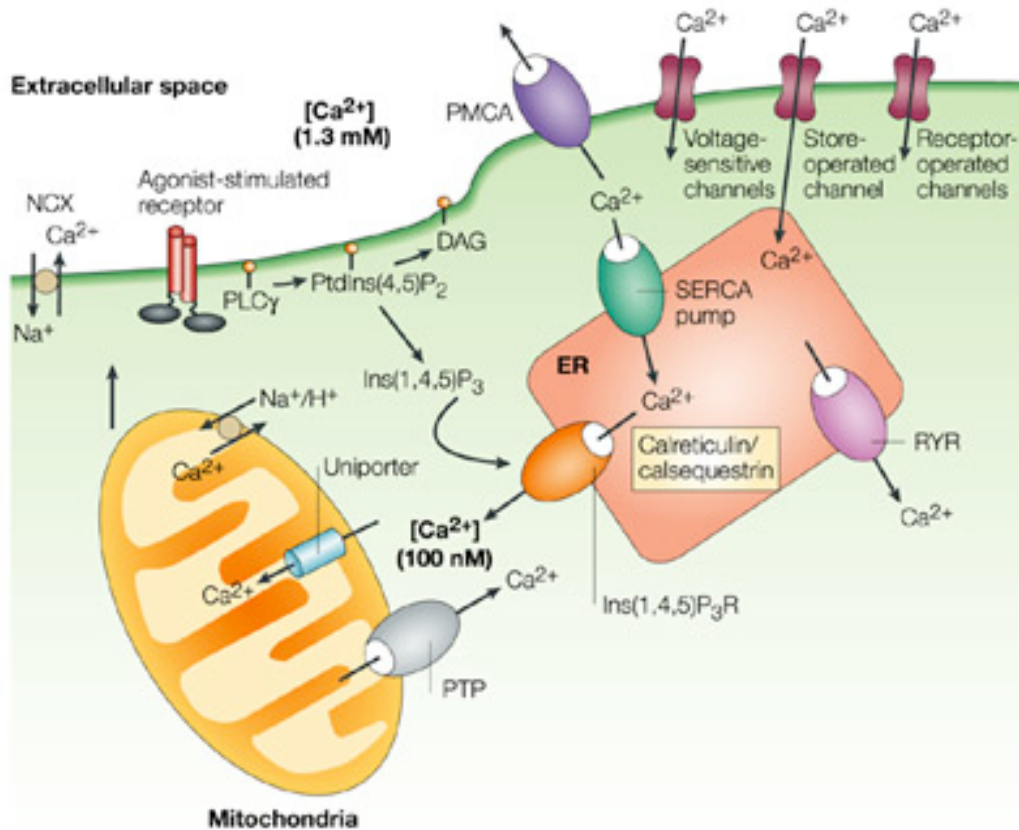


Abb. 1.1: Regulatoren der Calciumhomöostase in der Zelle (Orrenius et al. 2003), genaue Ausführungen im Text. Kapitel 1.1.1 - 1.1.3.

an der Plasmamembran: NCX = Natrium/Calcium-Austauscher, PMCA = CaAT-Pase, spannungsbabhängige Calciumkanäle

am endoplasmatischen Retikulum (ER): SERCA = sarkoendoplasmatische Calcium-ATPase, RYR = Ryanodin-Rezeptor, Calreticulin/Calsequestrin, Calcium-Calmodulin-abhängige Phosphatase, assoziiert mit dem Inositol (1,4,5)-Triphosphat Rezeptor

im Mitochondrium: PTP permeability transition pore, Calcium-Uniporter, Calcium/Na/H-Austauscher

1.1.3 Calcium-vermittelte Signale in Kardiomyozyten

Calcium spielt die Hauptrolle bei der elektromechanischen Kopplung (Bers 2002). Nach Depolarisierung der Membran triggert der Calcium-Influx durch L-

Typ Kanäle die Calcium-Freisetzung in das Zellplasma durch die Ryanodin-Rezeptoren (RyR2) aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Die daraus entstehende Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration aktiviert die Myosinfilamente zur Kontraktion. Um nach einer Kontraktion wieder relaxieren zu können, muss das Calcium aus den Kardiomyozyten wieder entfernt werden: via SERCA, die Calcium ins sarkoplasmatische Retikulum pumpt, und via NCX, der das Calcium in den Extrazellulärraum transportiert.

Calcium spielt nicht nur die Hauptrolle in der elektromechanischen Kopplung, es kann diese auch durch Regulation von Proteinen modulieren. Eines davon ist das Myofilament Troponin C (*Bers 2002*), ein anderes die Calcium-Calmodulin-Kinase. Calcium aktiviert außerdem den RyR2 direkt von zytosolischer Seite, zu hohe Konzentrationen hemmen ihn jedoch. Hohe sarkoplasmatische Calcium-Konzentrationen aktivieren ihn ebenso, was auch für die spontane Calcium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum bei Calcium overload und Arrhythmien eine Rolle spielen könnte (*Bassani et al., 1995; Lukyanenko et al., 1996; Györke et al., 1998; Pogwizd et al., 2001*). Intrazelluläres Calcium reguliert durch Bindung an den intrazellulären Teil des NCX dessen Calcium-Transport (*Matsouka et al., 2001; Weber et al., 1995*).

Fast alle Komponenten der elektromechanischen Kopplung sind einer Regulation durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung durch Enzyme unterworfen. CaMKII (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II), Calcineurin und die Myosin-Leichtkettenkinase sind drei Calcium-abhängige Enzyme in Kardiomyozyten, die auf die Herzfunktion Einfluss haben.

Die Calcium-Calmodulin-abhängige Phosphorylierung der Myosin-Leichtkettenkinase hat vor allem zwei Folgen: Die Calcium-Sensitivität der Myosinfilamente wird erhöht und damit auch die Kontraktilität (*Morano et al., 1985*), und außerdem vermittelt sie bei Hypertrophie in vitro die Organisation der Sarkomeren (*Aoki et al., 2000*).

Die CaMKII hingegen reguliert fast alle Komponenten, die etwas mit der elektromechanischen Kopplung zu tun haben. Sie phosphoryliert L-Typ-Kanäle und erleichtert damit den Calcium-abhängigen Calcium Influx (*Yuan et al., 1994; Xiao et al., 1994; Wu et al., 2001*), dann phosphoryliert sie Phospholamban und hebt damit dessen inhibitorischen Einfluss auf die SERCA am sarkoplasmati-

schen Retikulum auf, und somit kann Calcium aus dem Zytosol entfernt werden (*Mattiuzzi et al., 1995*), und schließlich phosphoryliert sie RyR2, der Effekt ist jedoch noch unklar, manche Studien besagen, dass die Phosphorylierung von RyR2 durch die CaMKII dessen Öffnungsrate erhöht (*Witcher et al., 1991; Wehrens et al., 2004; Hain et al., 1995*) oder erniedrigt (*Lokuta et al., 1995*).

Die Calcium-Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin, assoziiert mit dem Inositol (1,4,5)-Triphosphat Rezeptor, moduliert den Calcium-Fluss von RyR2 (*Cameron et al., 1995; Bandyopadhyay et al., 2000*).

Auch auf Transkriptions- und Expressionsebene von Genen spielt Calcium eine regulatorische Rolle (*Hardingham et al., 1998*). Hypertrophie wird im Herzen als Antwort der Kardiomyozyten auf Belastung durch Calcium-Signale induziert. Diese werden durch Calcium-Calmodulin-abhängige Wege in den Nukleus weitergeleitet (*Gruver et al., 1993*). Des Weiteren blockiert W-7, ein Calcium-Calmodulin Inhibitor, in Kardiomyozyten, die in Kulturen untersucht werden, Hypertrophie als Antwort auf Pacing und adrenerge Stimulation (*McDonough et al., 1992*). Dies lässt darauf schließen, dass Wege über die Calcium-Calmodulin-Kinase wichtig für Hypertrophie von Kardiomyozyten sind. Besonders wichtige Faktoren hierbei sind HDAC (histone deacetylase) und NFAT (nuclear factor of T-cell activation), die durch Phosphorylierung aktiviert werden und in das Transkriptionsgeschehen für Gene, die eine Hypertrophie bewirken, bei Kardiomyozyten eingreifen (*Passier et al., 2000; Molkenkin et al., 2000; Wilkins et al., 2000; Olson et al., 2003*).

Diese Art der Anbindung von Transkription an die elektromechanische Kopplung durch Calcium schließt auch die erhöhte Transkription von den Regulations- und Transport-Enzymen für Calcium mit ein wie SERCA, Phospholamban, NCX, RyR2 und CaMKII.

Damit ist Calcium ein wichtiges Signal-Molekül auf sehr unterschiedlichen Zeiteinheiten: von Sekunden bis zu Stunden oder Tagen, und ist in verschiedensten Prozessen involviert: elektro-mechanische Kopplung, Muskelkontraktion und Gen-Transkription.

1.1.4 Der β_1 -Rezeptor und seine Rolle bei der Apoptose

Die adrenerge Stimulierung des β_1 -Rezeptors löst durch Phosphorylierung des spannungsabhängigen Kanals in der Membran, des RyR2-Kanals im sarkoplasmatischen Retikulum und des Phospholambans durch Proteinkinase A (PKA) eine Verstärkung von Kontraktion und Output aus. Die Aktivierung dieser Proteine durch PKA erhöht die Freisetzung von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum während der Systole.

Im Stadium einer Herzinsuffizienz gerät dieses System in einen chronisch hyperadrenergen Zustand, da das geschwächte Herz nicht adäquat auf die adrenerge Stimulierung reagieren kann. Das führt zu einer ständigen Hyperphosphorylierung der RyR2-Kanäle, die eine Freisetzung von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum während der Diastole verursachen können (*Marx et al., 2000*). Wenn die Wiederaufnahme von Calcium in das SR durch die SERCA 2a vermindert ist, führt dies zu einer verminderten Calcium-Konzentration im sarkoplasmatischen Retikulum und zu einer kontraktile Dysfunktion.

Durch die Stimulierung des β -Adrenorezeptors werden nicht nur, wie oben beschrieben, durch Phosphorylierung einiger Enzyme Metabolismus und Kontraktion reguliert, sondern auch der Zelltod. Überstimulierung dieses Rezeptors führt zur Apoptose in Kardiomyozyten (*Zaugg et al., 2000; Zhu et al., 2001; Bisognano et al., 2000*). Anfängliche Studien propagierten, dass β -Rezeptor-induzierte Apoptose über cAMP/PKA weitergeleitet würde (*Communal et al., 1999; Iwai-Kanai et al., 1999*), Zhu et al. fanden jedoch 2003 heraus, dass dies auch über den Anstieg intrazellulären Calciums und CaMKII geschieht.

In einer Untersuchung bei Ratten- und Kaninchenherzen konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung mit Carvedilol, einem nicht-selektivem Betablocker, vor Ischämie- und Reperusionsphasen einen protektiven Effekt hat: Er reduziert die Apoptose- und Nekrose-Rate der Kardiomyozyten durch antioxidative Effekte und Beeinflussung von bestimmten Signalwegen, die noch Gegenstand der Forschung sind (*Schwarz et al. 2003, Asanuma et al. 2004*).

1.1.5 Calcium-overload und Apoptose

Bei Ischämie, Reperfusion und Applikation einiger Toxine erhöht sich die intrazelluläre Calcium-Konzentration (*Wasser et al., 1997*), es entsteht ein Influx von extrazellulär und eine Freisetzung von Calcium aus den Mitochondrien und dem sarkoplasmatischen Retikulum. Wird zum Beispiel während Reperfusion NCX inhibiert, so kann dies Apoptose in Kardiomyozyten verhindern (*Inserte et al., 2002*), ebenso reduziert sich die Apoptose-Rate nach Ischämie und Reperfusion bei Gabe von Calciumantagonisten (*Feng et al., 2004*).

Durch den intrazellulären Anstieg von Calcium erhöht sich die Membranpermeabilität und es kommt zu einem weiteren Calcium-Anstieg.

Dies führt letzten Endes über unten genauer erläuterte Wege ebenfalls zu einer Erhöhung der Permeabilität der Mitochondrienmembran durch PTP und damit zu einer Freisetzung von Cytochrom C, welches Apoptose induziert (*Orrenius 2003*).

1.2 Apoptose

Der Begriff Apoptose wurde durch Kerr, Wyllie und Currie 1972 begründet, kommt aus dem Griechischen und bedeutet „Blätter, die im Herbst von den Bäumen fallen“ (*Kerr et al., 1972*).

Apoptose ist eine Art des Zelltods, der durch ein ganz bestimmtes, streng geregeltes intrazelluläres Programm eingeleitet wird, bei welchem Zellen, die Suizid begehen, Enzyme aktivieren, die die zelleigene DNA im Zellkern und Zellproteine zu zerstören vermögen.

Die Zellmembran bleibt intakt, sie wird jedoch so verändert, dass die Zelle ein Ziel für Makrophagen darstellt. Dadurch wird die apoptotische Zelle rasch phagozytiert. Diese Art des Zelltods ruft keine Entzündungsreaktion hervor, ganz im Gegensatz zur Nekrose, die durch den Verlust der Membranintegrität, enzymatischen Abbau der Zelle und eine nachfolgende Entzündungsreaktion charakterisiert ist.

1.2.1 Physiologische Bedeutung der Apoptose und ihre Auslöser

Apoptose ist verantwortlich für einige physiologische Ereignisse. Tod durch Apoptose ist ein normales Phänomen, das dazu dient, Zellen, die nicht mehr „gebraucht“ werden, zu entfernen, zum Beispiel bei der Embryogenese während der Implantation oder der Organogenese oder zum Beispiel auch bei der hormonell bedingten Involution bei Erwachsenen, z. B. ovariale und folliculäre Atresie in der Menopause, Regression der laktierenden Brust nach dem Abstillen oder Atrophie der Prostata nach Kastration. Von zytotoxischen T-Zellen induzierter Zelltod dient zur Verteidigung gegen Viren und Tumore, um Zellen, die von Viren befallen oder neoplastisch degeneriert sind, zu eliminieren.

Apoptose ist jedoch auch für den Zellverlust während pathologischer Vorgänge verantwortlich: Zellschädigende Stimuli wie Strahlung und Zytostatika beschädigen die DNA, und wenn Reparaturmechanismen nicht ausreichen, wird die Apoptose eingeleitet. Ebenso können Hitze und Hypoxie Apoptose induzieren.

Morphologisch ist Apoptose durch Zellschrumpfung, Kondensation des Kernchromatins, Apoptosekörperchen und Phagozytose der apoptotischen Zellkörper und Zellen durch Makrophagen gekennzeichnet.

Ein biochemischer Nachweis von Apoptose ist zum Beispiel die enzymatische Zerstörung von Zellproteinen durch „Caspasen“, Enzyme, die normalerweise als inaktive Pro-Enzyme vorliegen und erst aktiviert werden, um Apoptose zu induzieren. Sind sie aktiviert, zerstören sie Zellproteine und aktivieren DNAsen, die wiederum DNA in Stücke zerschneiden.

Außerdem exprimieren apoptotische Zellen auf ihrer Zellmembran bestimmte Moleküle, wie z. B. Phosphatidylserin. Makrophagen vermögen diese Veränderung der Zellmembran früh zu erkennen und phagozytieren solch „gekennzeichnete“ Zellen, und zwar ohne Freisetzung proinflammatorischer Zellkomponenten.

1.2.2 Ablauf der Apoptose auf molekularer Ebene

Apoptose wird durch verschiedene molekulare Kaskaden initiiert, die am Ende zur Aktivierung von Caspasen führen. Man kann diese Ereignisse in eine Initia-

tionsphase, in der die Caspasen katalytisch aktiviert werden, und in eine Exekutionsphase, in der die Enzyme den Zelltod herbeiführen, einteilen. Initiiert wird Apoptose vor allem durch zwei Wege, einmal auf dem extrinsischen Weg bzw. über den Todeszellrezeptor (death receptor) und einmal auf dem intrinsischen bzw. mitochondrialen Weg. Auf diese soll im nachfolgenden Kapitel genauer eingegangen werden.

1.3 Apoptose in Kardiomyozyten, Stand der Forschung

1.3.1 Molekularer Ablauf

Wie in anderen menschlichen Zellen spielen die beiden Hauptwege der Initiierung von Prozessen – mitochondrial oder über den Todesrezeptor – auch in Kardiomyozyten die größte Rolle.

1.3.1.1 Zellstress-vermittelte Apoptose (siehe auch Abbildung 1.2)

Bei dem intrinsischen Weg werden Mitochondrien durch bestimmte Signale stimuliert, die durch sogenannte BH3-only proteins vermittelt werden. Daraufhin kommt es zu einer Konformationsänderung von Bax/Bak, ebenfalls Proteine, die zur Familie der BH-3-only proteins gehören und sich auf der Mitochondrienmembran befinden. Dadurch wird die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran vermutlich durch Porenbildung (sogenannte PTP = Permeability Transition Pore) zerstört. Daraufhin setzen Mitochondrien apoptogene Proteine frei, wie z. B. Cytochrom C, SMAC/Diablo, Omi/HtrA2, Endo G (= Dnase endonuclease G) und AIF (= apoptosis inducing factor) (*Susin et al., 1999*) und Caspasen, wobei jedoch die Freisetzung von Cytochrom C der entscheidende Schritt ist. Sobald sich Cytochrom C im Zellplasma befindet, bindet es mit dATP an Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1), es entsteht das so genannte mitochondriale Apoptosom (*Zou et al., 1999*). Dadurch wird die CARD-Region (= caspase recruitment region) von Apaf-1 freigelegt und der dATP-Apaf-1 Komplex lagert sich an die CARD-Region der Procaspase-9 (*Liu et al., 1996*). Daraus folgt die Aktivierung von Pro-Caspase-9, die außerdem verstärkt produ-

ziert wird. Die aktivierte Caspase-9 kann Pro-Caspase-3 aktivieren und führt zum Zelltod via Apoptose (*Slee et al., 1999*).

IAPs (=inhibitor of apoptosis proteins) sind eine Gruppe zytoplasmatischer Proteine, welche zur Regulation von Caspasenaktivität beitragen. Sie werden von zwei mitochondrialen Proteinen inhibiert: SMAC/Diablo, Omi/HtrA2, wodurch eine indirekte Aktivierung der Caspasen 9 und 3 zu beobachten ist.

Caspase-unabhängige Mechanismen der Apoptose entstehen über Endo G und AIF: Endo G gelangt in den Nukleus und bewirkt dort DNA-Fragmentierung, hierbei ist AIF beteiligt.

In Kardiomyozyten wird der intrinsische Weg durch verschiedene Stimuli in Gang gesetzt. Dies wurde für Kardiomyozyten in Kulturen mit Hypoxie aufgezeigt (*de Moissac et al., 2000; Malhotra und Brosius, 1999*), mit Hypoxie und Reoxygenierung (*Kang et al., 2000*), mit Serum/Glucose Entzug ± Desoxyglucose (*Bialik et al., 1999*) sowie mit reaktivem Sauerstoff (*von Harsdorf et al., 1999*). Auch bei isolierten, perfundierten Herzen von Nagetieren und bei infarzierten menschlichen Herzen wurde eine erhöhte mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C beobachtet (*Chen et al., 2001*).

1.3.1.2 Zelltodrezeptor-vermittelte Apoptose (siehe auch Abbildung 1.2)

Beim extrinsischen Weg binden lösliche Liganden wie TNF oder Zellmembranliganden wie Fas an eine spezifische Stelle des Todesrezeptors (FasL), der eine Todesdomäne (DD) an seinem zytoplasmatischen Teil besitzt und sich an der Plasmamembran der Zelle befindet. Dies löst eine Konformationsänderung des Rezeptors aus und setzt mit dem intrazellulären Adapterprotein FADD (= Fas associated death domain), die Caspasenkaskade in Gang. FADD hat zwei funktionelle Domänen, DD (death domain) und DED (death effector domain). Mit DD bindet es an FasL, mit DED an Procaspase-8. Diese wird dadurch aktiviert und kann nachfolgende Caspasen und/oder den intrinsischen Weg über Bid, einem Protein der BH3-only protein Familie, aktivieren.

Ein weiterer wichtiger Faktor beim extrinsischen Weg der Apoptose ist FLIP (= FLICE-like inhibitory protein). Es besitzt selbst keine proteolytische Aktivität und wird in verschiedenen Isoformen (FLIP-L und FLIP-S) exprimiert und konkurriert mit Procaspase 8 um die Bindungsstelle am Todesrezeptor (*Thome und*

Tschopp, 2001). Ihr Einfluß auf die Regulation der rezeptorvermittelten Aktivierung von Caspase-8 kann sowohl inhibitorisch als auch aktivierend sein. So verhindern hohe Konzentrationen von FLIP-L die Aktivierung von Caspase-8, indem sie vermutlich um Bindungsstellen kompetitieren. In niedrigen, physiologisch relevanten Konzentrationen hingegen kann FLIP-L vermutlich durch Heterodimerisierung mit Pro-Caspase-8 aktivierend wirken.

Anfänglich glaubten viele Forscher, der extrinsische Weg spiele keine große Rolle in Kardiomyozyten. 2003 zeigte Lee (*Lee et al., 2003*) jedoch, dass es auch in Kardiomyozyten einen extrinsischen Apoptoseweg gibt, in dem er Zellkulturen und gesunde Tiere mit einem Adenovirus versah, der Fas-Ligand exprimierte und damit den extrinsischen Weg aktivierte.

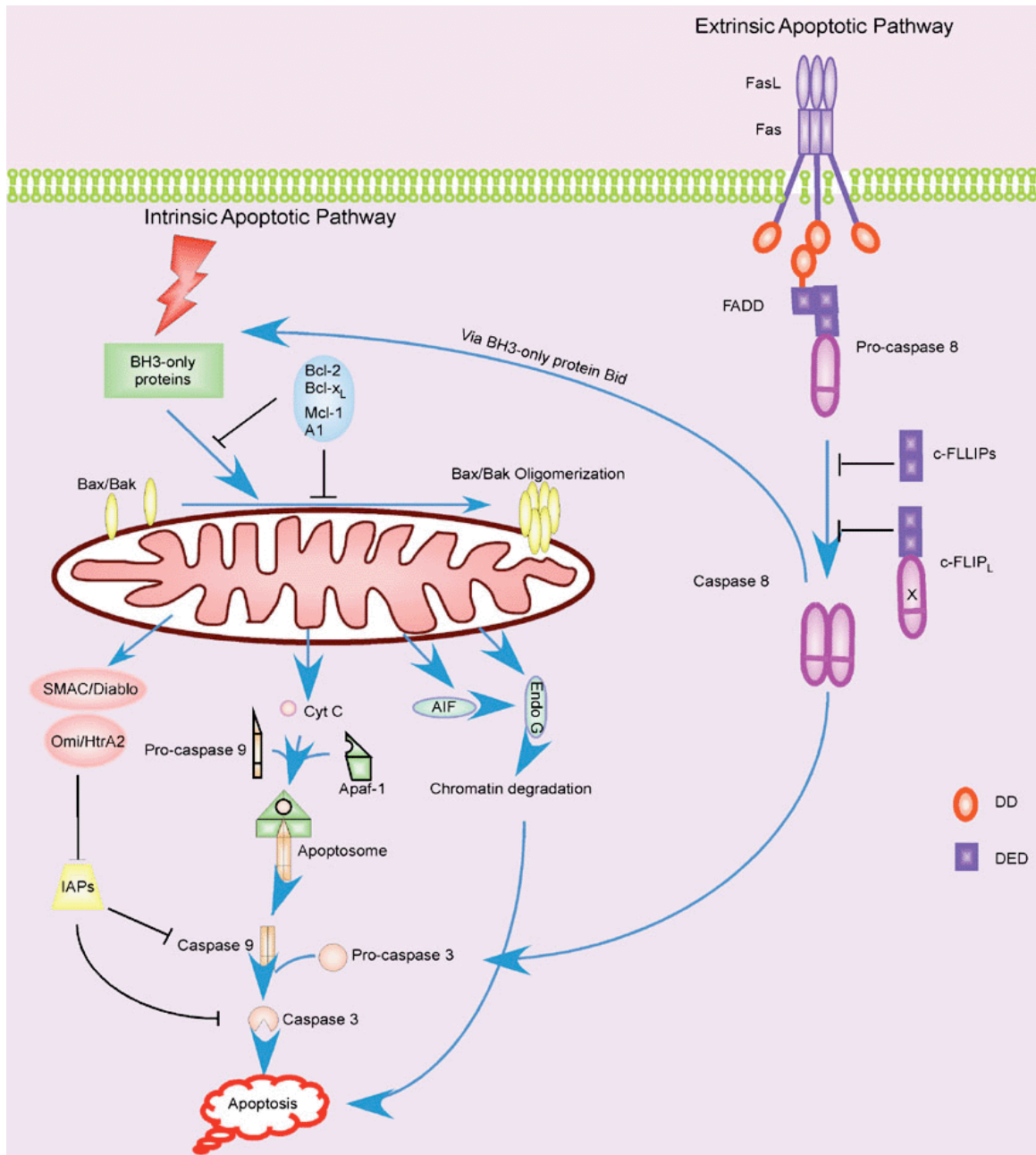


Abb.1.2: Die beiden wichtigsten Signalwege der Apoptose: Über den Todesrezeptor (extrinsisch) und über das Mitochondrium (intrinsisch). Aus Zhang et al. 2005, Cell Res., Seite 751, Erklärungen hierzu siehe Text 1.3.1.1 und 1.3.1.2

Abkürzungen: Endo G = Dnase endonuclease G, AIF = apoptosis inducing factor, Apaf-1 = apoptotic protease-activating factor-1, CARD-Region = caspase recruitment region, IAPs =inhibitor of apoptosis proteins, DD = death domain, FADD = Fas associated death domain, DED (death effector domain), Cyt C = Cytochrom C, FLIP (= FLICE-like inhibitory protein) mit Isoformen (FLIP-L und FLIP-S)

1.3.1.2 Verbindung zwischen extrinsischem und intrinsischem Weg

Eine Verbindung zwischen dem extrinsischen und intrinsischen Weg existiert über Bid (*Li et al., 1998 und Luo et al., 1998*), einem Protein der BH3-only protein Familie. In einigen Zelltypen wird Bid von Caspase-8 aktiviert. Das Carboxy-Ende von Bid wandert zu einem Mitochondrium und dringt in die äußere Membran ein. Dies stimuliert über oben dargestelltem Wege die Freisetzung von Cytochrom C (*Wei et al., 2000, 2001*). Bei Ischämie und Reperfusion an isolierten Herzen (*Chen et al., 2001 und Scarabelli et al., 2002*) wurde eine vermehrte Aktivierung von Bid und dessen Translokation in Mitochondrien beobachtet. Die Wichtigkeit von Bid bei der Pathogenese von Infarkten zeigt sich bei einem Experiment von Peng et al. (*Peng et al., 2001*), wo Mäuse, die kein Bid exprimieren, und Wildtypen einer Ischämie und Reperfusion unterzogen wurden. Es zeigte sich bei den Knockout-Mäusen eine Verringerung des infarzierten Gebietes um 53%.

ARC [apoptosis repressor with a CARD (caspase recruitment domain)] ist ein in Kardiomyozyten angereichertes Protein (*Geertmann et al., 1996; Koseki et al., 1998*), das Komponenten der Apoptose modulieren und in die Vorgänge eingreifen kann. Es wurde gezeigt, dass ARC mit Pro-Caspase-8 und Pro-Caspase-2 interagiert (*Koseki et al., 1998; Li et al., 2002*), aber auch, dass ARC Mitochondrien vor Stimuli wie Hypoxie und oxidativem Stress durch Verhinderung des Verlusts des Membranpotentials und Freisetzung des Cytochrom C schützt (*Ekhterae et al., 1999; Neuss et al., 2001*). In Ischämie- und Reperfusionsexperimenten wurde gezeigt, dass ARC die Infarktgröße verringern kann (*Gustaffson et al., 2002*).

1.3.1.3 Apoptose- Nachweis über PARP-1

Das Enzym Poly-(ADP-Ribose-)Polymerase (PARP) findet sich im Zellkern und katalysiert die DNA-Reparatur. Die DNA-bindende Domäne von PARP erkennt spezifisch DNA-Strangbrüche, die durch DNA-schädigende Einflüsse bei Eukaryonten entstanden sind. Hierbei dient Nikotin-Adenin-Dinukleotid (NAD) als Substrat.

Im Rahmen des programmierten Zelltods, der Apoptose, wird PARP enzymatisch durch Caspase-3 gespalten. Der Nachweis dieser Spaltprodukte gibt einen Hinweis auf stattgefundene Apoptose. Der Nachweis von PARP-1-Spaltprodukten über ein spezielles Färbekit ist auch bei Kardiomyozyten eine anerkannte Methode (*Malhotra et al. 1999*) zum Nachweis von abgelaufener Apoptose und wurde auch bei dieser Arbeit verwendet.

1.3.2 Mechanismen und Stimuli von Apoptose

Es wurde bereits in mehreren Studien belegt, dass es während der extrakorporalen Zirkulation bei herzchirurgischen Eingriffen zu Apoptose kommt (*Redwood et al., 1998; Aebert et al., 2000*).

Wichtige Stimuli für Apoptose in Kardiomyozyten sind Hypoxie (*de Moissac et al., 2000; Tanaka et al., 1994*), Verlust von Nährstoffen bzw. metabolischer Stress. Bialik et al. zeigten, dass die Apoptose-Rate in Kardiomyozyten bei einem Serum und Glucose-Entzug ansteigt. Blutserum enthält viele Wachstums- und andere überlebenswichtige Faktoren, die den Kardiomyozyten bei Ischämie fehlen und deshalb zu Apoptoseinduktion führen (*Fujio et al., 1997; Bialik et al., 1999; Sheng et al., 1997; Fujio, 2000; Wang, 1998; Aikawa, 2000; Kitta, 2001, 2003; Nakamura, 2000; Gu, 2001*).

Oxidativer Stress ist ein wichtiger apoptotischer Stimulus während der Reperfusionphase nach vorangegangener Ischämie. Kang et al. zeigten dies 2000 in einem Zellkulturmodell mit Hypoxie- und Reperfusionphasen. Neben anderen zellulären Veränderungen erhöht oxidativer Stress vor allem p53 und die Translokation von Bax und Bad in das Mitochondrium (*von Harsdorf et al., 1999*).

Mögliche apoptotische Stimuli sind bei Herzinsuffizienz auftretende mechanische Zugkräfte, Stretch genannt, (*Cheng et al., 1995*) und, wie oben erwähnt, β -adrenerge Überstimulation (*Zaugg et al., 2000; Zhu et al., 2001 und 2003*). Bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz oder auch nach einem Herzinfarkt ist der Serumspiegel von TNF (tumor necrosis factor- α) erhöht (*Levine et al., 1990; Mann, 2003*): TNF kann ebenfalls Apoptose in Kardiomyozyten hervorrufen (*Krown et al., 1996*). Bei einer Herzinsuffizienz ist auch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System aktiviert, was Konstriktion der Arterien und Retention von Salz und Wasser zur Folge hat. Die arterielle Konstriktion erhöht die Nachlast,

die retinierte Flüssigkeit erhöht die Vorlast und dehnt die Ventrikel. Damit induziert das RAAS indirekt Stretch-induzierte Apoptose (*Cheng et al., 1995*).

1.4 Ziele dieser Arbeit

Ziele dieser Arbeit waren es, ein Simulationsmodell zur Untersuchung von Calciumhomöostase und Apoptose bei humanen Kardiomyozyten im Zellverband zu etablieren.

Hierbei sollten Verhältnisse wie bei Herzoperationen mit Einsatz der extrakorporalen Zirkulation simuliert werden. Dazu wurde durch die spezielle Mikroperfusionskammer eine der extrakorporalen Zirkulation ähnliche Situation hergestellt. Der Versuchsaufbau sollte vor allem eine kontinuierliche simultane Untersuchung der Calciumhomöostase ermöglichen: zunächst während Verabreichung und Testung von Medikamenten, die die Calcium-Regulation beeinflussen, später aber auch bei Versuchen mit Myokardhypoxie und Reperfusionsphase. Außerdem sollte ein Vergleich zwischen Perfusion mit und ohne Kardioplegie vor Hypoxie/Reperfusion durchgeführt werden.

Nach den jeweiligen Versuchsabschnitten sollte anschließend eine immunhistochemische Apoptosedetektion mit PARP (Anti-Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase am zuvor untersuchten Gewebe stattfinden.

Die Fragestellung dabei war, inwiefern die Apoptose-Rate mit der jeweiligen Calciummessung korreliert und ob damit dieses einfache Modell der Calciummessung in der Mikroperfusionskammer zur simultanen Apoptosedetektion geeignet ist.

Da bei den Versuchen dieser Arbeit ausschließlich humane Kardiomyozyten im Zellverband untersucht wurden, wurden die Versuchsergebnisse mit Daten aus der Forschung zu diesen Themen verglichen, wo äußerst selten humane Kardiomyozyten als Material zu Verfügung stehen und meist isolierte Kardiomyozyten oder vollständige Tierexemplare untersucht wurden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Gewebeproben

Bei offenen Herzoperationen wird der Kreislauf zur Versorgung des Körpers mit sauerstoffreichem Blut durch die Herz-Lungen-Maschine gewährleistet. Die extrakorporale Zirkulation hat einen zuführenden und einen wegführenden Schlauch. Das venöse Blut aus den beiden Hohlvenen, welches sich im rechten Vorhof sammelt, läuft der Schwerkraft nach über die venöse Kanüle in das Reservoir der Herz-Lungen-Maschine. Hier durchläuft das desoxygenierte Blut den Membranoxygenator, wobei aus dem Blut CO₂ eliminiert und O₂ hinzugefügt wird. Anschließend wird das nun oxygenierte Blut über die arterielle Kanüle in der Aorta ascendens dem Systemkreislauf wieder zugeführt. Nach Anschluss an die extrakorporale Zirkulation wird das Herz von der Zirkulation ausgeklemmt, indem die Aorta ascendens proximal bzw., mit Bezug auf die arterielle Kanüle, herzwärts geklemmt wird. Anschließend wird die Blutkardioplegie mittels einer dünnen Kanüle in die Aorta ascendens injiziert oder, wie bei Aortenklappenersätzen, direkt über die Koronarostien appliziert.

Für diese Arbeit wurden bei ansonsten gesunden Patienten (N = 59), die sich einer routinemäßigen Herzoperation (aortokoronare Myokardrevaskularisation oder Aortenklappenersatz) unterzogen, Gewebeproben entnommen. Dabei handelt es sich um Resektate des rechten Herzohres, die vor der venösen Kanülierung für die Herz-Lungen-Maschine bzw. extrakorporale Zirkulation routinemäßig reseziert werden. Es wurde darauf geachtet, dass die Patienten keine infektiösen Erkrankungen aufwiesen und nicht an Vorhofflimmern litten. Die Methode wurde von der Ethikkommission genehmigt.

Die vor Beginn der extrakorporalen Zirkulation entnommenen Herzohren wurden zunächst in physiologischer Natriumchlorid-Lösung für die innerhalb der nächsten 10 min erfolgende Bearbeitung in das Labor gebracht.

2.1.2 Verwendete Chemikalien

Der Reinheitsgrad der verwendeten Chemikalien war „pro analysi“.

2.1.2.1 Fluoreszenzfarbstoff

Verwendet wurde Fura-2 AM [5-Oxazolcarbonsäure-, 2-(6-(bis(2-((acetoxy)methoxy)-2-oxoethyl)-amino)-5-(2-(2-(bis((acetyloxy)methoxy)-2-oxoethyl)amino)-5-methyl-phenoxy)ethoxy)-2-benzofuranyl) (acetyloxy)methylester] von Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Dies ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der ein charakteristisches Fluoreszenzverhalten bei 340 nm und bei 380 nm aufweist. Dabei ist 340 nm die calciumsensitive und 380 nm die calciuminsensitive Wellenlänge, Emissionswellenlänge ist 510 nm. Diese besondere Eigenschaft des Fura-2 AM wurde bei der Messung des intrazellulären Calciums genutzt, indem die mit Fura-2 AM beladenen Zellverbände alternierend mit der calciumsensitiven Wellenlänge bei 340 nm und mit der calciuminsensitiven Wellenlänge bei 380 nm angeregt und die Fluoreszenzsignale bei 510 nm emittiert wurden.

Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM wurde in 99%igem Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich) gelöst. Es wurde eine 10 mM Stammlösung hergestellt, auf 5 µM portioniert und bei -20° C aufbewahrt.

2.1.2.2 Perfusionslösungen

Als Perfusionslösung kam die Krebs-Henseleit-Lösung (KH) zum Einsatz, welche regelmäßig bei Perfusionsuntersuchungen z.B. auch bei Rattenherzen, verwendet wird (*Scharff et al. 1965, Angelos et al 2006*). Die Lösung wurde einmal mit und einmal ohne Calcium hergestellt. In KH ohne Calcium wurde EGTA, ein für Calcium spezifischer Chelator, anstatt Calciumchlorid (CaCl₂) verwendet.

Die genaue Zusammensetzung wird in unten stehender Tabelle 2.1 erläutert.

KH mit Calcium (mM)		KH ohne Calcium (mM)	
115	NaCl	115	NaCl
25	NaHCO ₃	25	NaHCO ₃
5,9	KCl	5,9	KCl
1,18	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	1,18	MgCl ₂ · 6 H ₂ O
1,23	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1,23	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O
1,19	Na ₂ SO ₄	1,19	Na ₂ SO ₄
2,5	CaCl₂ · 2 H₂O	0,5	EGTA
20	HEPES	20	HEPES
jeweils mit 1 M NaOH bzw. 1 M HCl auf einen pH = 7,3 eingestellt			

Tabelle 2.1: Zusammensetzung von Krebs-Henseleit-Lösungen mit und ohne Calcium (Angaben in mM)

Die Perfusionslösungen wurden mit pyrogenfreiem bidestilliertem H₂O (Ampuwa, Fresenius Kabi, Bad Homburg) angesetzt, danach eine Stunde mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂) begast. Sie wurden bei Raumtemperatur gelagert und vor ihrer Verwendung jedes Mal auf 37° C erwärmt und vor jedem Experiment mit 1 M HCl bzw. 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 7,30 eingestellt.

2.1.2.3 Kardioplegie

Bei Herzoperationen am nicht schlagenden Herzen kommt häufig die Blutkardioplegie zum Einsatz. Hierbei wird oxygeniertes, auf 4° C gekühltes Blut mit hohem Kaliumgehalt (60 mval, siehe Tab. 2.2) in bestimmten Zeitabständen (nach 20-minütigen Intervallen) über die Koronarostien verabreicht. Die Blutkardioplegie hat wegen bestimmter Bestandteile einerseits eine Schutzfunktion für das Herz, andererseits vermindert sie durch ihren hohen K-Gehalt (60 mval siehe Tabelle) das Membranpotential, so dass an der Membran der Kardiomyozyten kein neues Aktionspotential mehr entstehen kann und ein diastolischer Herzstillstand eintritt.

2.1.2.4 Modifizierte Kardioplegie

Aufgrund des Versuchsaufbaus wären simultane lichtmikroskopische Aufnahmen während Perfusion mit Blutkardioplegie nicht möglich gewesen. Daher wurde die Kardioplegie nach Buckberg, welche in der Apotheke des Universitätsklinikums Tübingen (Universitätsklinikum Tübingen, Apotheke, Röntgenweg 9, 72076 Tübingen) hergestellt wird, für die Experimente mit Verwendung der Krebs-Henseleit-Lösung modifiziert.

Zusätze (in g)	Kardioplegie
NaCl	1,62
NaOH 1 N	116,0
Glucose 1 H ₂ O	13,75
Aspartinsäure	7,54
Glutaminsäure	8,4
ACD-Puffer	50 ml
Tris-P. 36,34 %	20 ml
KCl 1 M	60 ml
Aqua bidest	680 ml
mit 1 M NaOH bzw. 1 M HCl auf pH = 7,3 eingestellt	

Tabelle 2.2: Zusammensetzung der Kardioplegie-Lösung, Rezeptur nach Buckberg

Für den jeweiligen Versuchstag wurde ein Teil Kardioplegielösung mit 60 ml KCl (1M) mit vier Teilen KH + Ca gemischt und im Kühlschrank aufbewahrt. Der pH-Wert wurde vor jedem Experiment mit jeweils 1 M HCl oder 1 M NaOH auf 7,30 eingestellt.

2.1.2.5 PBS

Phosphate Buffered Saline, Phosphatgepufferte Salzlösung, wurde von Biochrome (Berlin) bezogen.

2.1.2.6 Fixierungslösung für Kryoschnitte

Verwendet wurde 4%iges Paraformaldehyd in PBS (v/v). Es wurde im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

2.1.2.7 Blockierungspuffer

Der Blockierungspuffer bestand aus 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,3% Tween 20 (v/v) und 5% Milchpulver und wurde im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

2.1.2.8 Immunreagenz

Verwendet wurde ein polyklonaler Antikörper gegen PARP-1 (Poly-(ADP)-Polymerase) (Roche Molecular Biochemicals, Sandhofer Straße 116, 68305 Mannheim, Deutschland). 100 µl Immunreagenz wurden gemäß Protokoll der Firma in 200 ml Blockierungspuffer aufgelöst und in Portionen zu 1,5 ml bei -20° C aufbewahrt, Arbeitskonzentration 0,5 µl/ml.

2.1.2.9 PBT

PBT wurde aus PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung), 0,1% Rinderserumalbumin und 1% Tween 20 hergestellt und bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.1.2.10 Anti-Kaninchen-Ig-Fluorescein

Es wurde anti-rabbit-Ig-Fluorescein von CHEMIKON International (USA & Canada) verwendet. Es wurde eine Stammlösung mit 200 µg Fluorescein in 1 ml PBT hergestellt, welche für die jeweilige Färbung auf 40 µg/ml verdünnt wurde, Arbeitskonzentration 40 µg/ml.

2.1.3 Sonstige Chemikalien

Pluronic F-127 wurde in 20%iger Stammlösung in DMSO bei Raumtemperatur aufbewahrt. Pluronic ist ein schwaches Detergenz, das die Zellpermeabilität

erhöht und dem Fluoreszenzfarbstoff die Permeation in die Zelle erleichtert. Es wurde von Molecular Probes (Eugene, OR, USA) bezogen

2.2 Methoden

2.2.1 Entnahme von humanem Herzgewebe

Siehe hierzu Darstellung unter 2.1.1

2.2.2 Präparation der Resektate

Die Resektate wurden unmittelbar nach der Entnahme bearbeitet. Zu ihrer Aufarbeitung wurden Myokardstücke aus dem Resektat bei sterilen Bedingungen unter dem Lichtmikroskop mit dem Skalpell herausgetrennt und unter einem Auflichtmikroskop in ca. 500 μM messende Würfel geschnitten. Dabei wurden keine lichtmikroskopisch sichtbaren Anteile von Epi- und Endokard belassen, somit bestanden die Gewebeproben aus Kardiomyozyten und Bindegewebszellen. Gewebeproben von verschiedenen Patienten und Patientinnen wurden stets getrennt bearbeitet.

2.2.3 Bestimmung der Zellvitalität

Die Vitalität der Kardiomyozyten in den Zellverbänden (Lebendzellzahl $\geq 99\%$) war eine essentielle Voraussetzung für die weiteren Experimente und musste deshalb vor jedem neuen Experiment bestimmt werden. Um die Vitalität der Kardiomyozyten zuverlässig zu erfassen, wurden zwei Testmethoden (Fura-2 AM und Trypanblau) ausgewählt und auf ihre Aussagefähigkeit hin verglichen. Hierbei sollte die Vitalität von Kardiomyozyten aus jeweils zwei unterschiedlichen Gruppen von Zellverbänden erfasst werden. In beiden Gruppen wurden die Zellverbände stichprobenartig selektiert. Die erste Gruppe setzte sich aus je 10 unbehandelten Zellverbänden zusammen. In der zweiten Kontrollgruppe waren ebenfalls 10 Zellverbände vertreten, die zuvor mit 0,5%iger Saponinlösung entsprechend den Herstellerangaben (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) für 30 min inkubiert und abgetötet wurden.

Aufgrund der Präparation waren in den Randbereichen der Kardiomyozytenverbände 5-10% avitale Zellen festzustellen. Um verlässliche Ergebnisse zu liefern, wurden daher nur zentrale Bereiche der Verbände untersucht. Für die Auswertung wurden in jedem Zellverband fünf gleich große zentral gelegene Areale ausgewählt. In diesen Arealen erfolgte eine Auszählung von jeweils 20 Zellen. Daraus ergaben sich die Durchschnittswerte für den prozentualen Anteil an vitalen Kardiomyozyten in den Zellverbänden.

Für diese Untersuchungen wurde ein Nikon Labophot Y-2A Epifluoreszenz-Mikroskop verwendet, welches mit "long-distance" Objektiven bestückt war. Das Mikroskop sowie die Objektive wurden von Nikon (Nippon Kokagu K.K., Tokyo, J) bezogen.

2.2.3.1 Vitalitätsnachweis mit Fura-2 AM

Der Vitalitätsnachweis mit Fura-2 AM ist über die Prüfung der Intaktheit der Zellmembran möglich (*Silver 1998*). Als lipophiler Acetoxymethylester kann Fura-2 in die Zellen eindringen. Solange die Carboxyl- und Phenolgruppen noch nicht abgespalten sind, ist Fura-2 noch nicht calciumsensitiv, da die Indikatorgruppen nicht an freies Calcium binden können. In der Zelle werden die Estergruppen durch unspezifische Esterasen abgespalten und hydrolysiert. Der nun hydrophile Farbstoff kann bei integrierter Zellmembran diese nicht mehr passieren und also nicht mehr nach extrazellulär diffundieren. Er reichert sich somit in der Zelle an. Die polyanionischen Indikatorgruppen können freies Calcium binden, da die lipophilen Gruppen abgespalten sind und die Zelle fluoresziert.

Demnach kann eine Anreicherung von Fura-2 nur in intakten Zellen stattfinden, während bei avitalen Zellen, deren Membran nicht mehr intakt ist, der Fluoreszenzfarbstoff wieder herausdiffundieren kann. Vitale Zellverbände fluoreszierten leuchtend grün und deutlich stärker als nicht vitale. Mit Hilfe der unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten war eine Vitalitätsbestimmung möglich.

Dies wurde in Anlehnung an die Versuche von Weinlich et al. 2002 durchgeführt, wo BCECF-AM, ein über das gleiche Prinzip funktionierender Fluoreszenzfarbstoff, eingesetzt wurde (*Weinlich et al. 2002, Isenberg et al. 1993*). Nach erfolgten Versuchreihen zur Bestimmung der optimalen Beladung der Zellverbände mit Fura-2 AM, welche unter 2.2.4 beschrieben werden, wurden

die vitale und abgetötete Zellverbände zur Überprüfung der Vitalität mit 100 μM Fura-2 und 10 μL Pluronic in calciumhaltigen KH für 1 Stunde bei 37° C mit einer Carbogenbegasung = 95% O₂, 5%CO₂ inkubiert.

Die Untersuchungen erfolgten unter einem Nikon Labophot Y-2A Epi-Fluoreszenz Mikroskop bei einer Anregungs-Wellenlänge von 380 \pm 15 nm und einer Emissionswellenlänge von 510 \pm 15 nm in 20-facher Vergrößerung.

2.2.3.2 Vitalitätsnachweis mit der Trypanblau-Methode

Der Indikatorfarbstoff Trypanblau ermöglichte es, die Vitalität der Zellen ebenfalls über die Zellmembranintegrität zu bestimmen. Kardiomyozyten mit einer intakten Zellmembran sind für Trypanblau nicht permeabel, d. h. es kam zum Trypanblauausschluss.

Zur Versuchsdurchführung wurden vitale und abgetötete Zellverbände bei 37° C für 5 min mit 50 $\mu\text{l/ml}$ Trypanblau behandelt, in Hanks' Salzlösung gewaschen und dann unter dem Mikroskop in 20-facher Vergrößerung betrachtet.

2.2.4 Versuchsreihen zur optimalen Inkubation der Kardiomyozytenverbände mit Fura-2 AM

Die Beladung der Zellverbände erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Zu diesem Zweck waren mehrere Vorversuche erforderlich, um die optimale Beladung zu ermitteln, siehe hierzu auch Tab. 2.3 und 2.4. Es wurde zunächst gemäß Anleitung des Herstellers und in Anlehnung an die Versuche von Weinlich et al. zunächst die optimale Konzentration bei einer vorgegebenen Inkubationszeit von einer Stunde ermittelt, da auch bei den Versuchen mit BCECF-AM bei Duodenalvesikeln die optimale Inkubationszeit eine Stunde betrug (*Weinlich et al. 2002*). Danach wurde die Inkubationszeit des Fluoreszenzfarbstoffes in einer zweiten Versuchsreihe noch einmal erneut überprüft.

Zur Inkubation wurden jeweils etwa vier Verbände in einen Eppendorf-Behälter gegeben. Dann wurde eine Portion (5 μl) des tiefgefrorenen Fura-2 AM Farbstoffes aufgetaut, mit 10 μL Pluronic und 500 μL KH mit Ca vermischt und mit dem Vortexgerät geschüttelt. In unten stehenden Tabellen werden die Versuch-

reihen zur Ermittlung der optimalen Konzentration von Fura-2AM und der Inkubationszeit dargestellt. Die Inkubation fand bei 37° C und Stammzellkulturbedingungen (Carbogenbegasung = 95% O₂, 5% CO₂) im Brutschrank statt.

Gruppe (N =)	I (5)	II (5)	III (5)	IV (5)	V (5)
Konzentration Fura-2 AM (µM) (vorgegebene t = 60 min)	50	75	100	150	200

Tab. 2.3 : Versuchsreihe zur Ermittlung der optimalen Beladung mit Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM, Inkubation für 60 min

Gruppe (N=)	1 (5)	2 (5)	3 (5)	4 (5)	5 (5)
Inkubationszeit (min) Konz. {Fura-2 AM} = 100 µM	30	45	60	75	90

Tab. 2.4: Versuchsreihe zur Ermittlung der optimalen Inkubationszeit mit Fura-2 AM, vorgegebene Konzentration Fura-2 AM = 100 µM

Nachdem die Verbände beladen und auf Vitalität überprüft worden waren , wurden sie in eine mit KH gefüllte Spritze gegeben und vorsichtig gespült, um anhängende Farbstoffpartikel abzulösen. Nun konnten sie zur Untersuchung in die Mikroperfusionkammer gegeben werden.

2.2.5 Beschreibung des Mikroperfusionssystems

2.2.5.1 Aufbau der Mikroperfusionsskammer

Es wurde eine nach Weinlich et al. 2002 modifizierte Mikroperfusionsskammer verwendet. Die rautenförmige Mikroperfusionsskammer (Mk), mit einem Volumen von ca. 1000 μl , wurde in einen Plexiglasblock gestanzt. An der Innenseite der Mk wurden entgegengesetzt zwei vertikale Führungen (45°) mit 0,5 mm Breite in das Plexiglas gebohrt. Damit das Kunststoffnetz auf dem Plexiglasblock befestigt werden konnte, wurde es entsprechend der Breite der Mk oben und unten um 1 mm vertieft. Diese Vertiefungen wurden mit einem doppelseitigen Klebeband ausgelegt. Das verwendete Kunststoffnetz bestand aus Nylon. Auf Grund der durchschnittlichen Größe der Zellverbände wurde ein Kunststoffnetz mit einer Maschengröße von 400 μm (Firma Roland Vetter, Tübingen, D) verwendet. Es war 2,5 cm lang und 1,7 cm breit. Das Netz wurde in die Kammer eingespannt, indem es durch die beiden Führungen gezogen und mit Hilfe des Klebebandes auf den Plexiglasblock geklebt wurde. Das Kunststoffnetz konnte jederzeit von dem Plexiglasblock entfernt und erneuert werden. Das eingespannte Kunststoffnetz lag in einem Winkel von 45° gegen den Perfusionsstrom. Die verschiedenen Perfusionslösungen wurden sowohl mit einem Perfusorschlauch in die Mk geleitet als auch am anderen Ende wieder abgeführt. Die aufgebaute Mk wurde mit zwei Schrauben auf dem Kreuztisch des Nikon Labophot Y-2A Epifluoreszenz-Mikroskops angebracht.

2.2.5.2 Aufbau der Mikroperfusionsskammer für die Hypoxieversuche

Für die Hypoxieversuche wurde eine spezielle Mikroperfusionsskammer (Mk) entwickelt. Es wurden zwei der oben beschriebenen Perfusionskammern übereinander montiert, die jeweils einen getrennten Zu- und Ablauf hatten. Die verschiedenen Perfusionslösungen wurden durch Perfusorschläuche zu den Kammern geleitet. Kurz vor den Zuläufen befand sich ein Dreiwegehahn, von dem wiederum Schläuche zu den beiden Kammern führten. So wurde gewährleistet, dass beide Kammern mit gleicher Geschwindigkeit und mit dem gleichen Volumen pro Zeiteinheit perfundiert wurden.

2.2.5.3 Fixierung der Zellverbände in der Mikroperfusionskammer

Die Mikroperfusionskammer (Mk) wurde zunächst mit KH gefüllt. Ein Zellverband wurde mit Hilfe einer 50 ml Spritze aus der Petrischale entnommen. Die Spritze wurde über einen kurzen Perfusorschlauch mit der zuführenden Leitung der Mk verbunden. Der Zellverband wurde (nach Öffnen der abführenden Perfusionsleitung) in die Mk eingeströmt. Mit dem Perfusionsstrom wurde der Zellverband gegen das Netz geschwemmt. Mit Hilfe der Spritze konnte der Zellverband dabei in eine zentrale Position gebracht werden. Seine Position konnte zu jeder Zeit neu eingestellt werden. Dies geschah entweder durch Verändern der Perfusionsgeschwindigkeit oder durch Aufsaugen in die Spritze und Neupositionierung.

Die Perfusionsgeschwindigkeit in der Mk wurde vor dem Beginn der Experimente entsprechend der Größe und Form des Zellverbandes gewählt. Es wurde dabei darauf geachtet, dass während der Versuche eine gleichmäßige Perfusionsgeschwindigkeit erzielt wurde, weil sonst durch Turbulenzen die Position des Zellverbandes in der Mikroperfusionskammer verändert worden wäre, was zu Artefakten geführt hätte. Die Perfusionsgeschwindigkeit in der Mk wurde dazu auf 2 ml/min eingestellt.

Am Ende des Experiments wurde der Zellverband aus der Mk herausgenommen, indem er mit der Spritze herausgesaugt wurde. Anschließend wurde die Mk mit KH durchgespült und dabei das Kunststoffnetz gereinigt. Das Kunststoffnetz wurde nach jedem Versuchtag mit 99%igem Ethanol gereinigt und die Kammer alle 2 - 3 Wochen geöffnet, gründlich gereinigt und evtl. neu bestückt.

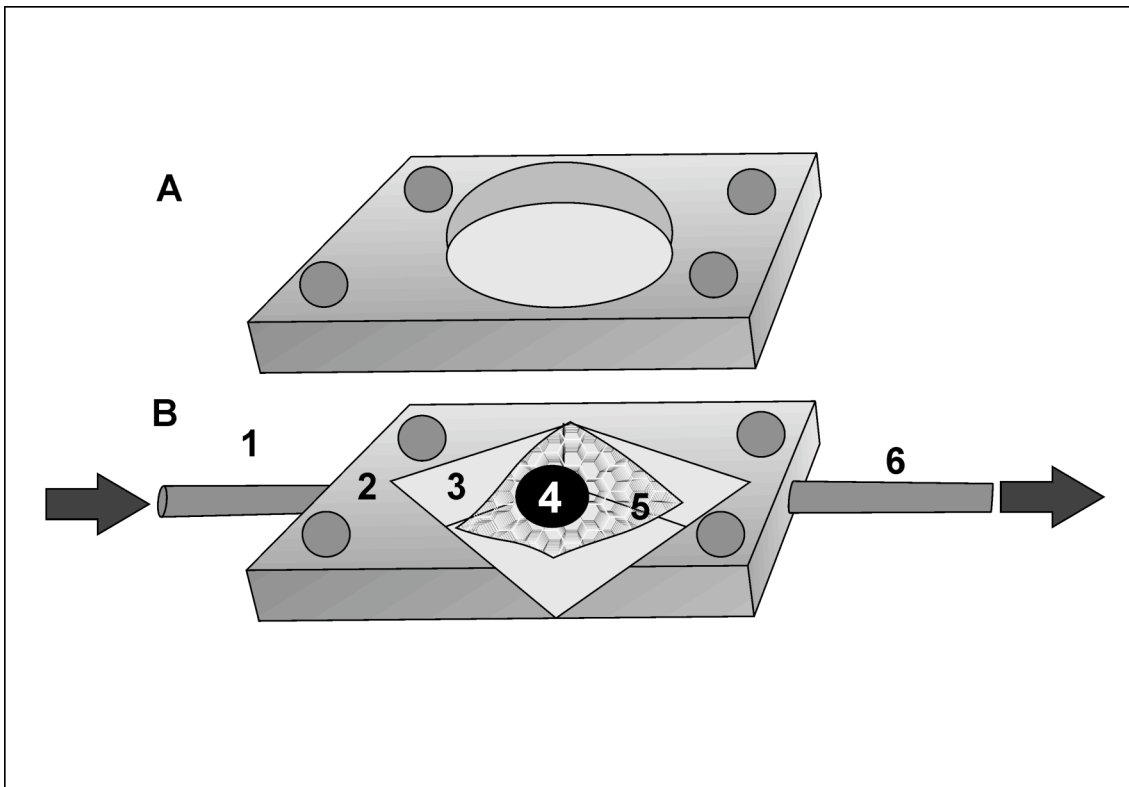


Abb. 2.1: Oben beschriebene Mikroperfusionskammer bestehend aus A = Oberteil, B = Unterteil mit 1 = zuführende Leitung, 2 = Plexiglasblock, 3 = hineingestanzte Kammer 4 = Kardiomyozytenzellverband, 5 = Netz, 6 = abführende Leitung (aus E. Usta, 1999)

2.2.6 Beschreibung des Perfusions- und Begasungssystems

Wie unten in Abb. 2.2 schematisch dargestellt bestand das Perfusionssystem neben der Mk aus einer temperierten Kammer mit 12 Vorratsbehältern (50 ml Perfusorspritzen), in denen die jeweiligen Perfusionslösungen aufbewahrt und thermometerkontrolliert auf 32° C erwärmt wurden. Jeweils sechs Vorratsbehälter wurden über Perfusorschläuche an einen HPLC-Wechsler angeschlossen. Dieser ermöglichte ein schnelles und luftblasenfreies Wechseln auf die einzelnen Perfusionslösungen. Der HPLC-Wechsler wurde über einen Perfusorschlauch an die Mk angeschlossen. Mit einer Schlauchklemme wurde die Zufuhr zur Mk reguliert und auf eine Perfusionsgeschwindigkeit von 2 ml/min eingestellt. Der Inhalt der Mk wurde in der Minute ca. zweimal vollständig ausgetauscht.

Für die Hypoxieversuche wurden Perfusionslösungen mit einer Temperatur von 4° C benötigt. Dafür wurden die Vorratsbehälter mit den jeweiligen Lösungen in mit Eis befüllte Styroporbehälter gestellt. Die zur Mikroperfusionskammer führenden Schläuche wurden isoliert und ebenfalls durch Behälter mit Eis geführt. Am Ablauf wurde die Temperatur der zu kühlenden Flüssigkeiten mit digitalen Thermometern kontrolliert.

Die Sauerstoff- bzw. Carbogenanreicherung der jeweiligen Perfusionslösungen fand über Blasen-Oxygenation statt. In die temperierte Kammer mit den Vorratsbehältern (50 ml Perfusorspritzen) für die Perfusionslösungen waren Gasleitungen in Form von Schläuchen eingebracht, welche an im Labor befindliche Gasbehälter angeschlossen waren. Die Gaszufuhr wurde über einen Drehmechanismus am Gasbehälter reguliert.

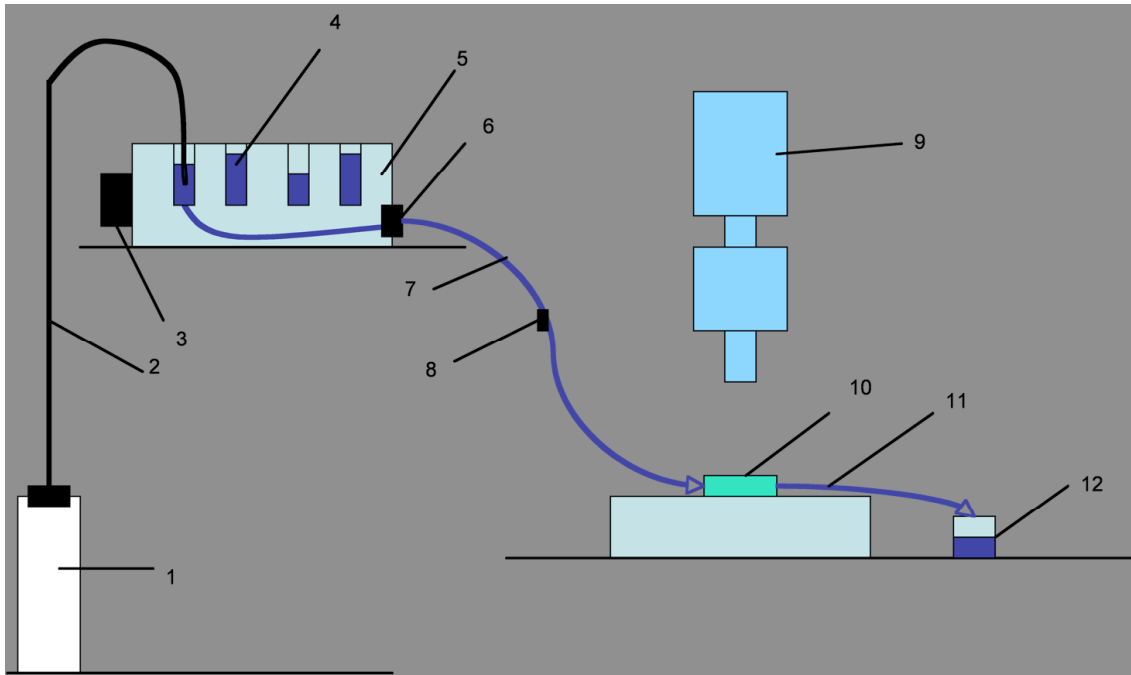


Abb. 2.2: Perfusions- und Begasungssystem, Versuchsaufbau, detaillierte Beschreibung in 2.2.6.

1 = Gasbehälter, 2 = Gasleitungen, 3 = elektrischer Fön und Thermometer zur Temperierung der Kammer = 5, 4 = Perfusorspritze mit Perfusionsflüssigkeit, 6 = HPLC-Wechsler, 7 = zur Mk führender Perfusorschlauch, 8 = Schlauchklemme zur Regulation der Perfusionsgeschwindigkeit, 9 = Fluoreszenzmikroskop, 10 = Mikroperfusionskammer, 11 = abführender Perfusorschlauch, 12 = Auffangbehälter

2.2.7 Beschreibung der Messapparatur

Die Messapparatur bestand aus folgenden Einheiten (Abb. 2.3):

- Lichtquelle: Xenonlampe (XE100 W, Nikon)
- Filtrerrad, bestückt mit zwei Anregungsfiltern 340 ± 15 nm und 380 ± 15 nm (Omega Optical, Brattleboro, VT, USA)
- Epi-Fluoreszenz Mikroskop (Labophot Y-2A, Nikon)
- mit einem B-2A Filterblock (Anregungsfilter 340 - 380 nm, halbdurchlässiger Spiegel 510 ± 15 nm, Emissionsfilter 520 nm) von Omega Optical
- CCD (cooled-coupled-device)-Kamera
- Personal-Computer (Compaq Pro Linea)
- SONY Trinitron RGB Monitor GVM-1411 QM
- Videomikroskopie- und Bildverarbeitungssystem Hamamatsu Argus 50, inklusive Soft- und Hardware

Das Filtrerrad, die CCD-Kamera sowie das Bildverarbeitungssystem Hamamatsu Argus 50 wurden von Hamamatsu Photonics (Herrsching, D) bezogen.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde das Licht von der Xenonlampe erzeugt und passierte einen der alternierend angewählten Anregungsfilter auf dem Filtrerrad. Das Anregungslicht traf auf einen halbdurchlässigen Spiegel auf und wurde durch ein "long-distance" Objektiv der Firma Nikon als Auflicht auf den Zellverband geleitet. Die Anregungszeit betrug hierbei weniger als eine halbe Sekunde. Das emittierte Licht wurde über den halbdurchlässigen Spiegel weitergeleitet, passierte dann einen Emissionsfilter mit der Wellenlänge 510 ± 15 nm und traf auf die darüber angebrachte CCD-Kamera. Die CCD-Videokamera registrierte Pixel für Pixel die eintreffenden Fluoreszenzsignale vom gewählten Ausschnitt des Zellverbandes und übertrug sie als Videosignale auf das Bildverarbeitungssystem Argus 50. Die eintreffenden Signale wurden zunächst vom Image Prozessor bearbeitet, in 256 Graustufen konvertiert und erschienen anschließend auf dem Sony RGB Monitor. Zur besseren Verfolgung der Zellantwort wurden die Graustufen in Falschfarben (pseudo-colors) umgewandelt, wobei Rot eine hohe und Blau eine niedrige Fluoreszenzintensität darstellte.

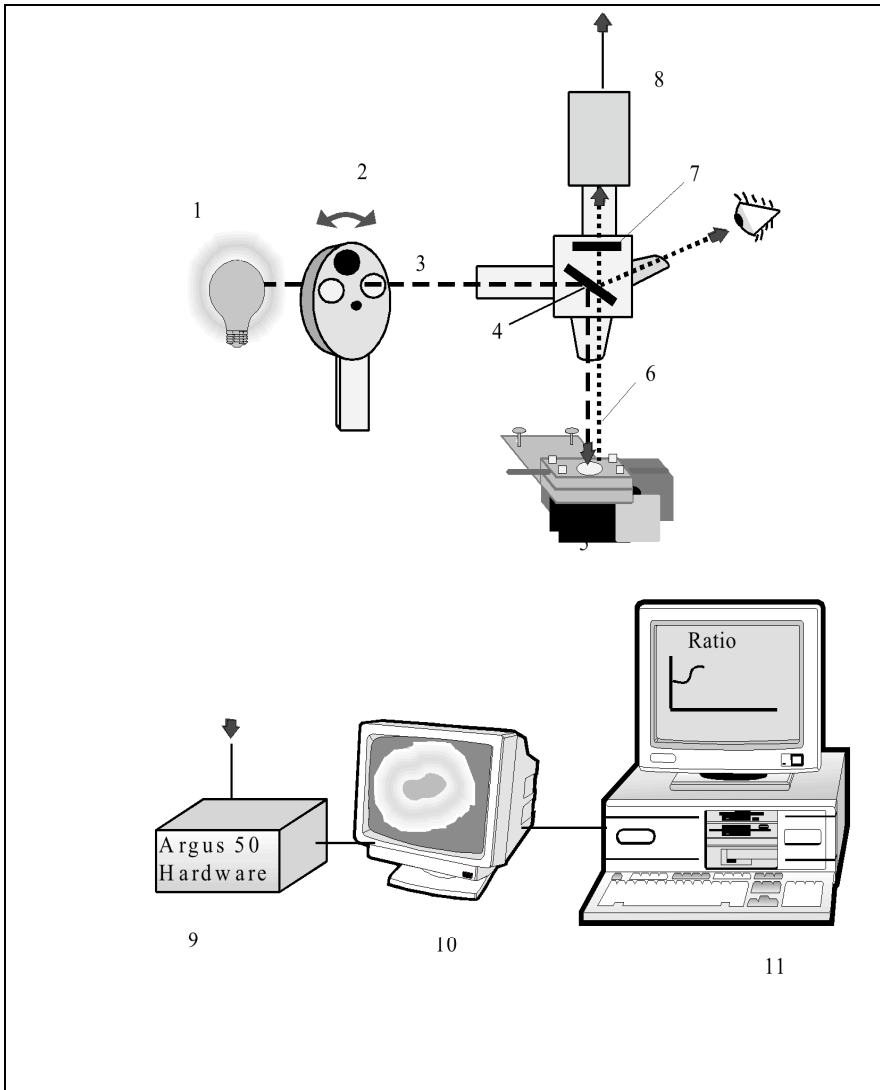


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Meßapparatur (aus E. Usta, 1999)

1 = Lichtquelle, 2 = Filterrad, 3 = Anregungslicht, 4 = halbdurchlässiger Spiegel, 5 = Mikroperfusionslammer, 6 = Emittiertes Fluoreszenzsignal, 7 = Emissionsfilter, 8 = CCD-Kamera, 9 = Argus 50 Hardware, 10 = SONY RGB Monitor, 11 = PC

2.2.8 Ratio imaging – Auswertung der Fluoreszenzintensität mittels Ratio-Bildung

Die Methode der Ratio-Bildung basiert auf der nicht-invasiven Untersuchung des intrazellulären Calcium-Gehalts mit dem calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM. Er hat neben der calciumsensitiven Anregungswellenlänge von 340 nm auch eine calciuminsensitive Anregungswellenlänge von 380 nm, bei der die Fluoreszenzintensität des Fura-2 AM von Änderungen des intrazellulären Calcium-Gehalts nicht beeinflusst wird. Beides wird bei einer Emissionswellenlänge von 510 nm gemessen. Aus dem Verhältnis der gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurde das Ratio (R) berechnet:¹

$$R = \text{calciumsensitiv 340 nm} / \text{calciuminsensitiv 380 nm}$$

Dies bewirkt eine Reduktion der Einflüsse von Störfaktoren: Einflüsse durch Farbstoffausbleichung, eventuellen Farbstoffaustritt aus den Zellen oder Farbstoffkonzentrationsänderungen sowie die Sensitivität der Messapparatur hätten die Aussagekraft einer Messung deutlich beeinflusst. Aufgrund der Ratiometrie konnten diese Faktoren weitestgehend vernachlässigt werden, da sich die Veränderungen auf beide Wellenlängen gleichermaßen ausgewirkt hätten.

2.2.9 Untersuchung der intrazellulären Calcium-Regulation an Kardiomyozytenverbänden

2.2.9.1 Inkubation mit Fluoreszenzfarbstoff

Die Kardiomyozytenverbände wurden mit den bei -20° C aufbewahrten Einzelportionen des Fluoreszenzfarbstoffes (Fura-2 AM, 100 µM), 10 µl Pluronic sowie 500 µl KH bei Stammzellkulturbedingungen im Brutschrank inkubiert.

¹ Das Hintergrundfluoreszenzsignal sowie die Autofluoreszenz des Kunststoffnetzes und der Zellverbände wurden in dieser Rechnung nicht berücksichtigt, da sie während der Messungen minimal waren und vernachlässigt werden konnten.

2.2.9.2 Grundlagen-Versuche der Calciumhomöostase bei intakten Zellverbänden (N = 10)

Um herauszuarbeiten ob einfache physiologische Reaktionen in diesem Modell bei intakten Kardiomyozyten untersuchbar sind, wurde als Grundlagenversuch der „Calcium-Entzug“ gewählt. Hier wurde vorausgesetzt, dass bei Perfusion mit calciumfreier Lösung ein Calcium-Verlust der Kardiomyozytenzellverbände stattfinden muss und sich dies, wenn das Modell funktioniert, in der Ratiokurve durch ein Sinken der Werte abzeichnet.

Nach Inkubation der Kardiomyozytenverbände für 1 Stunde in 100 μ M Fura-2 AM im Brutschrank bei 37° C unter Stammzellkulturbedingungen (Carbogenbe-gasung) im KH + Ca Puffer wurde jeweils ein Kardiomyozytenverband per Spritze in die Mikroperfusionskammer eingebracht. Die Mikroperfusionskammer war mit KH + Ca befüllt. Die Messapparatur wurde angeschlossen und die Fluoreszenzintensität in Form der dargestellten Ratiokurve am Monitor daraufhin beobachtet, ob sich ein steady state einstellt. Dieser Abschnitt dauerte 5 min.

Wenn sich ein Gleichgewicht eingestellt hatte, wurde im Perfusionssystem auf eine Perfusion mit KH ohne Calcium umgestellt. Bei einem Abfall der Ratiokurve und schließlich Erreichen eines Tiefpunkts, was in der Regel ca. 35 min dauerte, wurde wieder die Perfusion mit KH + Ca aufgenommen. Nach 15 min war der Ausgangsratiowert erreicht.

2.2.10 Simultane Calcium-Messung während Kardioplegiegabe, Hypoxie und Reperfusion

Wie unten in Tabelle 2.5 dargestellt, wurden 4 verschiedene Gruppen gebildet: Kardioplegie/Hypoxie und Kardioplegie/Hypoxie/Reperfusion sowie die Kontrollgruppen Hypoxie und Hypoxie/Reperfusion ohne vorherige Kardioplegiegabe. In jeder Gruppe wurden 2 Proben gleichzeitig in der doppelten Mk unter den gleichen Bedingungen untersucht. Der einzige Unterschied war, dass sich im oberen Teil der Mk der mit Fura-2 AM beladene Zellverband befand und im unteren Teil der für die Apoptose-Bestimmung vorgesehene Zellverband.

Alle Gruppen wurden 5 min lang mit KH + Ca perfundiert (37° C, Carbogenbe-gasung). Danach wurden die Proben der Kardioplegie/Hypoxie und Reperfusionsversuche für 5 min mit der oben beschriebenen kristalloiden Kardioplegielösung (4° C) perfundiert, die Kontrollgruppen direkt mit KH ohne Ca (4° C, Stickoxydbegasung) ohne vorherige Kardioplegiegabe. Hypoxiezeiten waren 20, 40, 60 min, danach wurden die Proben bei den Reperfusionsuntersuchungen zunächst für 5 min mit KH ohne Ca (35° C, Carbogen) reperfundiert, dann für den Rest der Reperfusionsphase mit KH + Ca (35° C, Carbogen). Die Reperfusionszeit betrug ein Drittel der jeweiligen Hypoxiezeit, also 7, 13 und 20 min. Nach der jeweiligen Perfusionsphase wurden Proben aus der Mk entfernt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Das Versuchsprotokoll wurde in Anlehnung an die Abfolge der Kardioplegie-Verabreichung während Herzoperationen entwickelt. Um die Situation in vivo möglichst genau nachzuempfinden, wurden die Perfusionslösungen gekühlt. Die Reperfusion wurde, entsprechend den Abläufen in vivo, auf ein Drittel der Ischämiezeit festgelegt. Es musste jedoch zu Anfang dieser Phase für 2 min KH ohne Ca gegeben werden, da sonst bei extrazellulärer Calcium-Verabreichung diese die intrazelluläre Regulation gestört hätte und die Unterscheidung zwischen Fluoreszenzanstieg durch Calcium-Aufnahme und Fluoreszenzanstieg durch Effekte der Reperfusion nicht möglich gewesen wäre.

Probe	KH (min)	Hypoxie (min)	Reperfusion (min)	N=
Kardioplegie/Hypoxie	5	20 mit Kardio	-	5
	5	40 mit Kardio	-	5
	5	60 mit Kardio	-	5
Reperfusion	5	20 mit Kardio	7	5
	5	40 mit Kardio	13	5
	5	60 mit Kardio	20	5
Hypoxie Kontrolle	5	20 ohne Kardio	-	5
	5	40 ohne Kardio	-	5
	5	60 ohne Kardio	-	5
Reperfusion Kontrolle	5	20 ohne Kardio	7	5
	5	40 ohne Kardio	13	5
	5	60 ohne Kardio	20	5

Tab. 2.5: Versuchsprotokoll Kardioplegie-Perfusion, Kontrollgruppen ohne Kardioplegie-Perfusion (Kardio = Kardioplegie)

2.2.10.1 Unbehandelte Kardiomyozyten

Es wurden fünf Zellverbände unbehandelt separat in einem Röhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80° C aufbewahrt.

2.2.10.2 Hypoxieversuche mit Kardioplegiegabe

Es wurde die doppelte Mk verwendet, in die obere Kammer wurde ein mit Fura-2 AM beladener Zellverband gegeben, in die untere ein unbehandelte Zellverband. Die beiden Kammern wurden zunächst 5 min mit KH + Ca unter Carbogenbegasung perfundiert, bis ein steady state erreicht wurde, danach erfolgte die Gabe von 4° C kalter Kardioplegie für 7 min, ebenfalls unter Carbogenbegasung. Dann wurde unter Stickoxydbegasung (Hypoxie) KH ohne Ca 4° C gegeben. Die Zeiten wurden von Versuch zu Versuch von 20 min bis 60 min variiert (siehe Tabelle 2.5).

2.2.10.3 Reperfusionsversuche mit Kardioplegiegabe

Nach Beladung der beiden Kammern wurde zunächst 5 min mit KH + Ca unter Carbogenbegasung perfundiert, bis ein steady state erreicht wurde, danach erfolgte die Gabe von 4° C kalter Kardioplegie für 7 min, daraufhin Hypoxie für 20, 40 und 60 min.

Die Reperfusionszeit betrug jeweils 1/3 der vorausgegangenen Kardioplegie- und Hypoxiezeit, wobei dieses Regime dem während einer routinemäßigen Herzoperation angewandten Vorgehen entstammt. Die Reperfusionszeiten betragen 7 min bis 20 min (siehe Tabelle 2.5 und 2.6), so lange wurden die Verbände mit KH ohne Ca 35° C perfundiert. Zuletzt wurde ca. 15 min mit KH + Ca perfundiert, bis die Ratiokurve einen steady state erreichte.

Nach dem Versuch wurden die Zellverbände der unteren Kammer in einem Röhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C aufbewahrt.

Die Reperfusionszeit errechnet sich aus der Kardioplegie-Perfusionszeit und der Hypoxiezeit:

$$1/3 \times (\text{Kardioplegiezeit} + \text{Hypoxiezeit}) = \text{Reperfusionszeit}$$

Hypoxiezeit in min	20	40	60
Reperfusionszeit in min	7	13	20

Tab. 2.6: Hypoxiezeiten mit korrelierenden Reperfusionszeiten

2.2.10.4 Kontrollgruppen ohne Kardioplegie-Perfusion

In die obere Kammer der doppelten Mk wurde ein mit Fura-2 AM inkubierter Zellverband gegeben, in die untere Kammer ein unbehandelter Zellverband des gleichen Patienten. Es wurde zunächst unter Carbogenbegasung mit KH + Ca für 7 min perfundiert, dann erfolgte die Gabe von KH ohne Ca 4° C unter Stickoxydbegasung für 20, 40 und 60 min (Hypoxie). Bei der Kontrollgruppe für Reperfusion folgte nun die Perfusion mit KH + Ca für 7, 13, 20 min.

Am Versuchsende wurden die Proben der unteren Kammer in einen Eppendorffbehälter gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C aufbewahrt.

2.2.11 Anfertigung der Kryoschnitte

Die gefrorenen Zellverbände (N = 65) wurden im Pathologischen Institut der Universität Tübingen (Institut für Pathologie, Liebermeisterstraße 8, 72076 Tübingen, Ärztlicher Direktor Prof. Dr. F. Fend) mit einem speziellen Gewebekleber (Tissue-Tek O.C.T. Compound; Made for Sakura Finetek Europe B.V., AA Zoeterwoude, The Netherlands) auf einen Stempel aufgebracht, dieser wurde im Kryotom auf -20° C gefroren, dann wurden Schnitte angefertigt, welche auf beschichtete Objektträger (Firma Sigma-Aldrich) aufgebracht wurden. Diese wurden dementsprechend beschriftet und bei -80° C bis zur späteren Auswertung in laboreigenen Gefrierschränken aufbewahrt.

2.2.12 Färbung der Kryoschnitte mit Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1)

Die Kryoschnitte wurden nach folgendem Protokoll gefärbt:

Zunächst wurden die Schnitte der Zellverbände mit PBS gewaschen und danach in 4% Paraformaldehyd/PBS (v/v) für 15 min bei 20° C fixiert.

Darauf wurden sie zweimal mit PBT gewaschen und 60 min bei 20° C mit dem Immunreagenz, Konzentration 0,5 µl/ml, inkubiert.

Danach wurden sie wieder zweimal mit PBT gewaschen und 30 min mit dem Kaninchen-Ig-Fluorescein, Arbeitskonzentration 40 µg/ml, inkubiert.

Zum Schluss wurden die Schnitte der Zellverbände zweimal in PBS gewaschen, darauf konnten sie an einem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden.

Als Kontrolle hierfür diente ein unbehandelter mit HE gefärbter Zellverband, bei dem die angefärbten Kardiomyozyten in 3 verschiedenen Gesichtsfeldern ausgezählt wurden. Danach wurde derselbe unbehandelte Zellverband mit PARP-1 gefärbt und die Anzahl der apoptotischen Zellen pro Gesichtsfeld ausgezählt.

2.2.13 Fotodokumentation

Die gefärbten Kryoschnitte wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Dieses war an einen Computer angeschlossen. So konnten die Bilder mit

Hilfe einer Digitalkamera auf den Computer übertragen und auf CD ROM gespeichert werden

2.2.14 Statistik

Die Graphiken und Analysen der intrazellulären Calciumregulation wurden mittels Sigma Plot Software (Version 9.9, SPSS Inc., Chicago, IL) hergestellt. Alle Daten wurden als arithmetisches Mittel (mean) +/- dem Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean = SEM) ausgedrückt. Die Zahl der voneinander unabhängigen Versuche wurde mit N bezeichnet. Zur statistischen Analyse wurde JMP software package (Version 6.0, SAS institute, Cary, NC, USA) verwendet. Bei der Auswertung der Daten wurde Rat und Unterstützung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Klaus Dietz vom Institut für Medizinische Biometrie, Tübingen, eingeholt. Demnach wurde bei einer Normalverteilung der Ergebnisse Student's t-test, ansonsten die Multivarianzanalyse (ANOVA) eingesetzt. Ein Wahrscheinlichkeitswert $p < 0,05$ wurde als signifikant gewertet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Morphologie der Zellverbände

Das Alter der Patienten und Patientinnen betrug im Mittel $57,38 \pm 5,96$ Jahre (mean \pm SD), 58% der Patienten waren weiblich.

Die aus den resezierten Herzohren durch Fragmentierung mit einem Skalpell gewonnenen Zellverbände waren ca. 500 μ m im Durchmesser groß. Um den durch die Bearbeitung entstandenen Zelldetritus und einzelne Kardiomyozyten zu entfernen, wurden die Zellverbände vor der Inkubation in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und mit einem Vortexgerät geschüttelt. Es wurden nur Zellverbände verwendet, die unmittelbar nach Probenentnahme bearbeitet werden konnten, eine Größe von 500 μ m Kantenlänge hatten und keinerlei zentralen Gewebsschaden aufwiesen. Dies wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 20facher Vergrößerung nach erfolgter Beladung untersucht.

3.2 Vitalitätsnachweis und Auswahl von geeigneten Zellverbänden

3.2.1 Vitalitätsnachweis mit Fura-2 AM

3.2.1.1 Vitale Zellverbände

Nach der Fragmentierung mit dem Skalpell und Entfernung von Zelldetritus und einzelnen Zellen konnten die Zellverbände mit Fura-2 beladen werden. Die Zellverbände, die im weiteren Verlauf untersucht wurden, bestanden im zentralen Teil des Kardiomyozytenverbandes stets zu mehr als 99% aus vitalen Kardiomyozyten. Dies war die Voraussetzung für die nachfolgende Inkubation und Verwendung für die Experimente.

Avitale Zellen befanden sich häufiger im Randbereich des Zellverbands, was am ehesten durch das stattgehabte Trauma bei der Fragmentierung mit dem Skalpell entstanden war. Hier kam es durch 5-10% avitale Zellen zu einer Flu-

reszenzminderung. Daher wurden nur Proben aus dem Zentrum der Zellverbände in der Mk untersucht.

Insgesamt konnten 10% der untersuchten Zellverbände wegen zu geringer Vitalität nicht zu weiteren Untersuchungen verwendet werden; durchschnittlich lag die Vitalität der Zellverbände bei 95%.

3.2.1.2 Abgetötete Zellverbände

In zuvor in 0,5%iger Saponinlösung abgetöteten Zellverbänden war temporär eine minimale und mit einem raschen Intensitätsverlust verbundene Fluoreszenz zu beobachten. Eine Untersuchung dieser abgetöteten Zellverbände war aufgrund des schwachen Fluoreszenzsignals nicht möglich.

3.2.2 Vitalitätsnachweis mit der Trypanblau-Methode

3.2.2.1 Vitale Zellverbände

In vitalen Zellverbänden konnte Trypanblau die intakte Zellmembran der Kardiomyozyten nicht penetrieren. Nur Reste von Zelldetritus auf der Oberfläche der Verbände wurden durch Trypanblau angefärbt. Auch hier galt, nur wenn die Zellverbände stets zu mehr als 99% aus vitalen Kardiomyozyten bestanden, erfüllten sie die Voraussetzung für die nachfolgende Inkubation und Verwendung für die Experimente.

Auch hier kam es bei 10 % der untersuchten Zellverbände zu einer zu geringen Vitalität, so dass hiermit keine weiteren Experimente mehr stattfinden konnten.

3.2.2.2 Abgetötete Zellverbände

In zuvor in 0,5%iger Saponinlösung abgetöteten Zellverbänden war eine einheitliche Anreicherung mit Trypanblau im Zytoplasma sowie im Zellkern der Kardiomyozyten nachzuweisen.

3.2.3 Optimale Inkubation der Kardiomyozytenverbände mit Fura-2 AM

Bei der Inkubation zeigte sich nach oben beschriebenen Versuchsreihen, dass eine Konzentration von 100 μ M Fura-2 AM in KH bei Stammzellkulturbedingun-

gen (Carbogenbegasung) hierfür optimal ist (siehe Tab. 2.3). Die optimale Inkubationszeit beträgt 1 Stunde (siehe Tab. 2.4): Unter diesen Bedingungen war eine Beladung von über 99% der Kardiomyozyten im zentral gelegenen Anteil des Zellverbandes mit Fura-2 AM zu erreichen. Die Fluoreszenzintensität war bei einer Emissionswellenlänge von 510 nm ausreichend, d.h. bei mittlerer Sensitivität des Mess- und Bildverarbeitungssystems (Hamamatsu Argus 50, siehe Abb. 2.3) erreichte der Zellverband nach Umwandlung der Graustufen zu 90% rote Falschfarben (pseudo colors), was einer hohen Fluoreszenzintensität entspricht.

In der anschließenden Untersuchung mit dem Lichtmikroskop bei 20-facher Vergrößerung waren keine morphologischen Unterschiede vor und nach der Inkubation festzustellen.

Bei kürzerer Inkubationszeit oder geringerer Farbstoffkonzentration war lediglich ein schwaches Fluoreszenzsignal (blaue Falschfarben >80%) zu erkennen. Bei zu hoher Konzentration und zu langer Inkubation ließ sich ebenfalls nur ein blaues Fluoreszenzsignal erkennen, welches auf äußere Einflüsse, z.B. Änderung der Calciumkonzentration des extrazellulären Raumes, nicht adäquat reagierte oder unverändert blieb (keine Änderung der Falschfarben in rote oder orange Farben).

3.3 Grundlagenversuche, Calcium-Entzug

Diese Versuche dienten als Grundlage zur Untersuchung der physiologischen Calciumregulation bei Kardiomyozyten im Zellverband und bildeten den Nachweis der Brauchbarkeit des Modells für weitere Untersuchungen.

Nachdem der Zellverband in die MK überführt und durch Perfusion mit calciumhaltigem KH ein initialer steady state erreicht worden war, wurde durch eine ca. 35-minütige Perfusion mit calciumfreiem KH ein Abfallen der Ratiokurve von einem Ausgangswert von $1,60 \pm 0,04$ Ratioeinheiten um $0,15 \pm 0,04$ Ratioeinheiten beobachtet, sie stieg nach Calciumgabe wieder an und erreichte dann ihren Ausgangswert mit $1,59 \pm 0,05$ wieder ($p < 0,05$). Somit ergab sich hier ein Δ Ratio = $\text{Ratiowert}_{\text{Versuchsende}} - \text{Ratiowert}_{\text{Versuchsanfang}} \leq 0,01$ Ratioeinheiten.

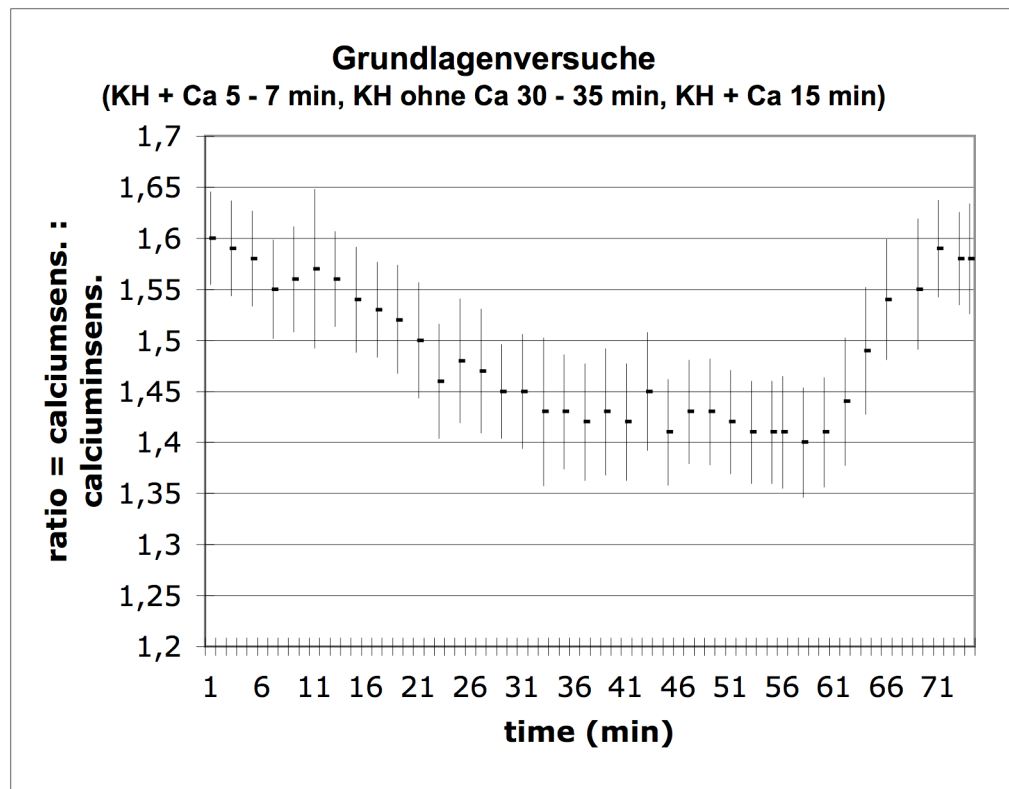


Abb. 3.1: Grundlagenversuche, Calcium-Entzug, N = 10, in Mittelwerten \pm SEM angegeben.

3.4 Simultane Calcium-Messung während Kardioplegiegabe, Hypoxie und Reperfusion

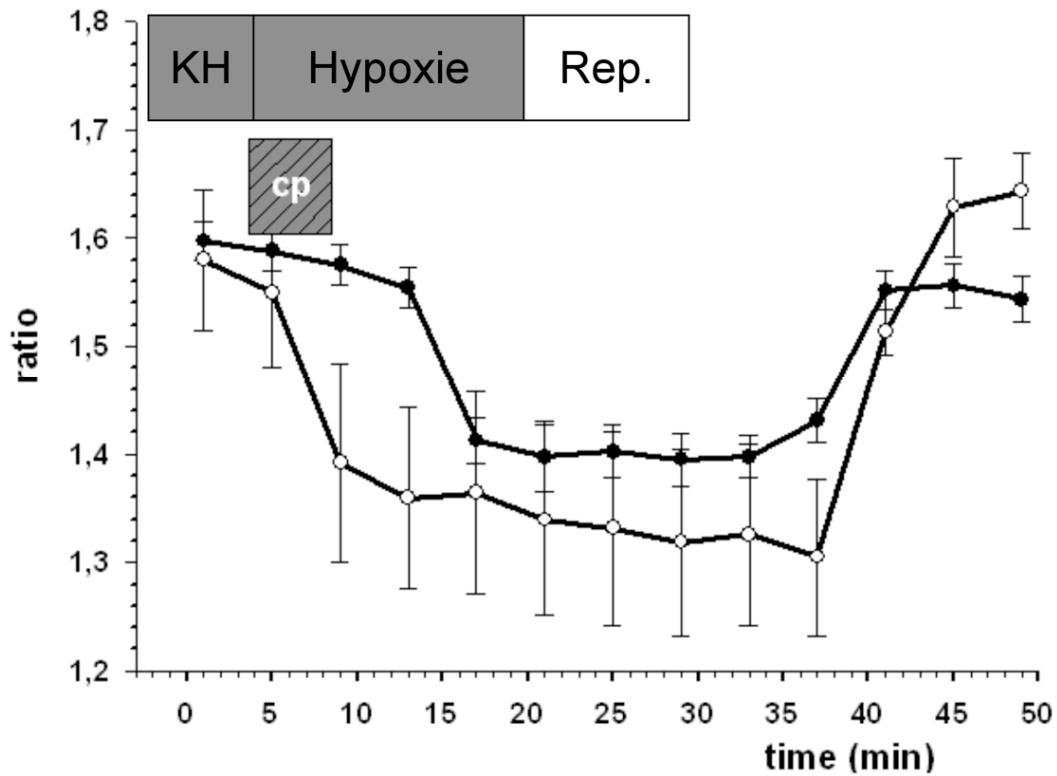
3.4.1 Ergebnisse der Calcium-Messung

In den Gewebeproben, welche vor Ischämie und Reperfusion mit Kardioplegie perfundiert worden waren, wurde keine signifikante Erhöhung des intrazellulären Calciums am Ende des Versuches beobachtet. Die Calcium-Rückregulation war weiterhin größtenteils intakt (hier Δ -Ratio = End-Ratiowert - Anfangs-Ratiowert $\leq 0,02$).

In den Kontrollgruppen, Hypoxie und Reperfusion ohne Kardioplegie, war Δ Ratio = Ratiowert_{Versuchsende} - Ratiowert_{Versuchsanfang} der Fluoreszenzkurve signifikant erhöht ($p < 0,05$). Dieser Δ -Ratio korrelierte positiv mit der Länge von Hypoxie und Reperfusion, wie es auch in Tabelle 3.1 sowie in den Abbildungen 3.2 - 3.4 dargestellt wird.

Gruppe	Hyp./Rep. min	Anfangs- Ratio (SEM)	End- Ra- tio (SEM)	Δ - Ratio	N
Kardioplegie Hypoxie Reperfusion	20/7 (Gruppe 1)	1,57 (0,01)	1,58 (0,01)	0,01	5
	40/13 (Gruppe 2)	1,56 (0,02)	1,56 (0,01)	0	5
	60/20 (Gruppe 3)	1,60 (0,01)	1,62 (0,01)	0,02	5
Kontrollgruppe Hypoxie Reperfusion (ohne Kardi- oplegie)	20/7 (Kontrolle 1)	1,59 (0,04)	1,65 (0,02)	0,06	5
	40/13 (Kontrolle 2)	1,68 (0,02)	1,83 (0,02)	0,15	5
	60/20 (Kontrolle 3)	1,52 (0,01)	1,77 (0,05)	0,25	5

Tabelle 3.1: Werte der Ratiokurve am Anfang und am Ende der Versuche, aufgeteilt in Länge der Hypoxie- und Reperusionsphasen, in den Kontrollgruppen waren die End-Ratiowerte bzw. Δ -Ratio signifikant ($p < 0,05$) erhöht (in Mittelwerten \pm SEM angegeben)



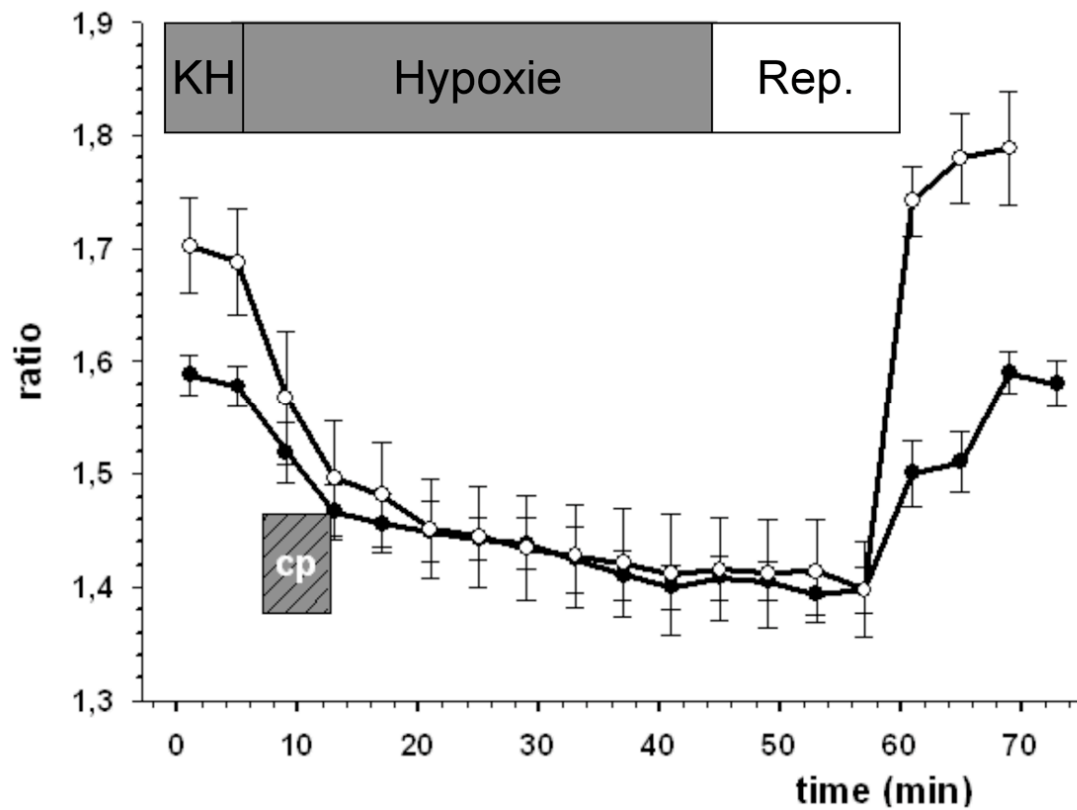
—●— Gruppe 1: 20 min Hypoxie nach Kardioplegie + 7 min Reperfusion

—○— Kontrolle 1: 20 min Hypoxie + 7 min Reperfusion

ratio = R = calciumsensitiv 340 nm : calciuminsensitiv 380 nm

KH= Krebs-Henseleit-Lösung, rep = Reperfusion, cp = Kardioplegie

Abb. 3.2: Vergleich 20 min Hypoxie und 7 min Reperfusion nach Kardioplegie mit Kontrollgruppe ohne Kardioplegie (in Mittelwerten \pm SEM angegeben), Endratio-Werte in der Kontrollgruppe signifikant erhöht (hierfür $p < 0,05$)



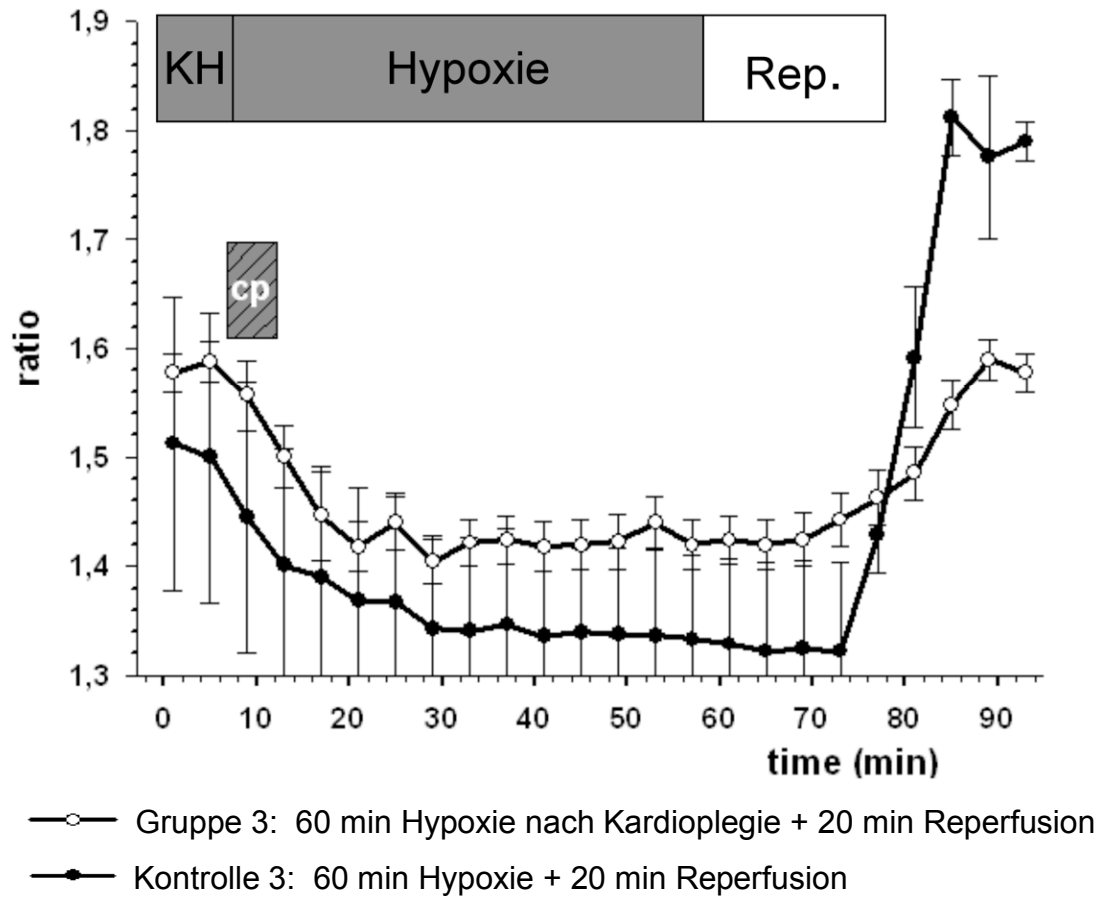
—●— Gruppe 2: 40 min Hypoxie nach Kardioplegie + 13 min Reperfusion

—○— Kontrolle 2: 40 min Hypoxie + 13 min Reperfusion

ratio = R = calciumsensitiv 340 nm : calciuminsensitiv 380 nm

KH= Krebs-Henseleit-Lösung, rep = Reperfusion, cp = Kardioplegie

Abb. 3.3: Vergleich 40 min Hypoxie und 13 min Reperfusion nach Kardioplegie mit Kontrollgruppe ohne Kardioplegie (in Mittelwerten \pm SEM angegeben), End-ratio-Werte in der Kontrollgruppe signifikant erhöht (hierfür $p < 0,05$)



ratio = R = calciumsensitiv 340 nm : calciuminsensitiv 380 nm

KH= Krebs-Henseleit-Lösung, rep = Reperfusion, cp = Kardioplegie

Abb. 3.4: Vergleich 60 min Hypoxie und 20 min Reperfusion nach Kardioplegie mit Kontrollgruppe ohne Kardioplegie (in Mittelwerten \pm SEM angegeben), End-ratio-Werte in der Kontrollgruppe signifikant erhöht (hierfür $p < 0,05$)

3.4.2 Apoptosedetektion mittels PARP-1-Färbung

Mittels HE-Färbung wurden alle in einem unbehandelten Zellverband enthaltenen Zellen markiert und konnten ausgezählt werden. In drei verschiedenen ausgezählten mikroskopischen Gesichtsfeldern mit 20facher Vergrößerung betrug die Anzahl der Kardiomyozyten jeweils $222 \pm 14,79$ (mean \pm SEM). Es konnte zwischen Kardiomyozyten mit größeren Zellkernen und Fibroblasten mit kleineren Zellkernen unterschieden werden. Durchschnittlich enthielten die Kryoschnitte circa $20,5 \pm 10,7$ kleinere oder zerstörte Kerne in 3 Gesichtsfeldern bei 20-facher Vergrößerung, welche nicht ausgezählt wurden.

Auf die durchschnittliche Gesamtanzahl aller Zellen in 3 Gesichtsfeldern bei 20facher Vergrößerung der HE-Färbung wurde die Anzahl der apoptotischen Zellen in der PARP-1-Detektion bezogen. Als Kontrolle hierzu war der oben beschriebene unbehandelte Kardiomyozytenverband mit PARP-1 gefärbt worden. Hier stellten sich $14,67$ (SEM = $0,88$) Zellen pro Gesichtsfeld in 20facher Vergrößerung als apoptotisch dar.

Man konnte beobachten, dass die Anzahl der durch die PARP-1-Färbung detektierten apoptotischen Zellen mit der Länge der Hypoxie- und Reperfusionzeit signifikant zunahm, wie in unten stehender Tabelle 3.3 dargestellt wird.

Wie unten in Abbildung 3.5 zu sehen, trat durch vorherige Perfusion mit Kardioplegie vor Hypoxie und Reperfusion eine wesentlich niedrigere Apoptose-Rate auf ($p < 0,05$).

Ergebnisse

Anzahl apoptotischer Zellen	a- nach 20 min mean ± SEM (% gesamt)	nach 40 min mean ± SEM (%gesamt)	nach 60 min mean ± SEM (%gesamt)
Gruppe 1	10,3 ± 0,70 (4,6)	18,2 ± 1,23 (8,2)	20,3 ± 0,50 (9,14)
Gruppe 2	24,7 ± 0,73 (11,1)	28 ± 1,00 (12,6)	32,3 ± 1,43 (15,6)
Gruppe 3	35,0 ± 1,00 (15,8)	63,5 ± 0,53 (28,6)	92,0 ± 2,00 (41,4)
Gruppe 4	48,5 ± 1,50 (21,9)	89,5 ± 2,50 (40,3)	128,5 ± 3,50 (57,9)
Kontrolle, unbehandelt	14,67 ± 0,88; (6,6)		

Tab. 3.3: Anzahl der apoptotischen Zellen nach Gruppen aufgeschlüsselt, mit Anteil der apoptotischen Zellen an der Gesamtzahl aller Zellen (in Mittelwerten und SEM angegeben, in Klammern prozentualer Anteil der apoptotischen Zellen an mittlerer Gesamtzellzahl (222 ± 14,79) pro Gesichtsfeld des unbehandelten Zellverbandes): Es stellt sich ein signifikanter Anstieg apoptotischer Zellen mit Zunahme von Hypoxie und Reperfusionzeit dar (p hier <0,05), nach vorheriger Kardioplegie-Perfusion signifikant niedrigere Anzahl apoptotischer Zellen (p < 0,05)

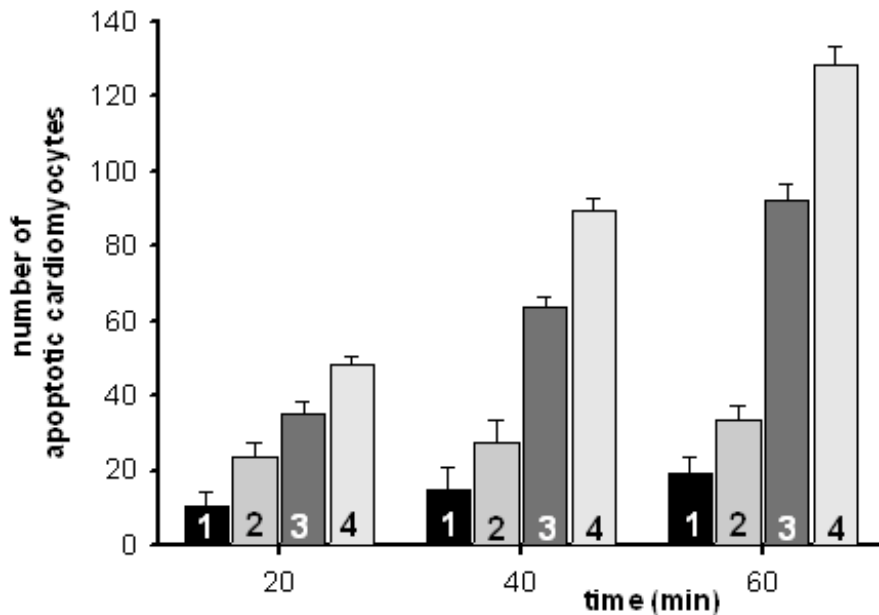
Gruppe 1 = Kardioplegie – Hypoxie

Gruppe 2 = Kardioplegie – Hypoxie – Reperfusion

Gruppe 3 = Hypoxie ohne Kardioplegie

Gruppe 4 = Hypoxie – Reperfusion ohne Kardioplegie

Kontrolle = unbehandelter Zellverband, schockgefroren



1= Kardioplegie – Hypoxie
 2= Kardioplegie – Hypoxie – Reperfusion
 3= Hypoxie ohne Kardioplegie
 4= Hypoxie – Reperfusion ohne Kardioplegie
 Kontrolle, unbehandelt: 14,67 apoptotische Zellen (hier nicht als Balken abgebildet)

Abb. 3.5: Diagramm zum Vergleich der Apoptose-Rate bei Hypoxie und Reperfusion mit (1 + 2) und ohne (3 + 4) vorherige Kardioplegiegabe (in Mittelwerten \pm SEM angegeben, N pro Balken = 5, auf der x-Achse ist die Zeit aufgetragen, auf der y-Achse ist die Anzahl PARP-1 positiver Zellkerne aufgetragen):

Es wurde erstens ein zeitabhängiger signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg von apoptotischen Zellen nach Hypoxie und Reperfusion beobachtet und zweitens eine signifikant niedrigere Apoptose-Rate ($p < 0,05$) bei Kardiomyozyten, die mit Kardioplegie vor Hypoxie und Reperfusion perfundiert worden waren.

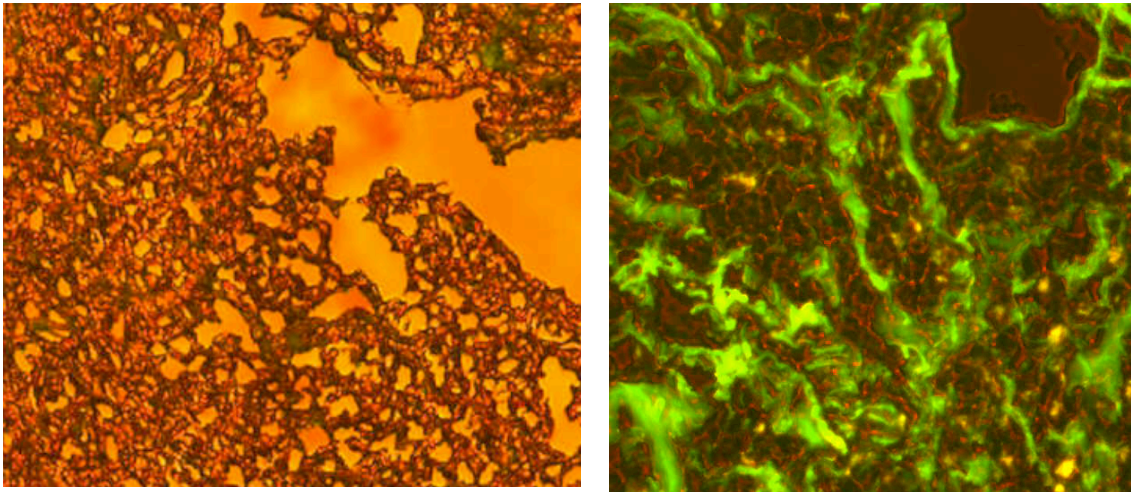


Abb. 3.6: Abbildung eines unbehandelten Kardiomyozytenverbandes, links Aufnahme unter dem Auflichtmikroskop bei 20-facher Vergrößerung, rechts ebenfalls 20-fache Vergrößerung. Hier Färbung mit PARP-1-Antikörper. Zellmembran in hellgrün, PARP-1-Antikörper im Zellkern in orange fluoreszierend.

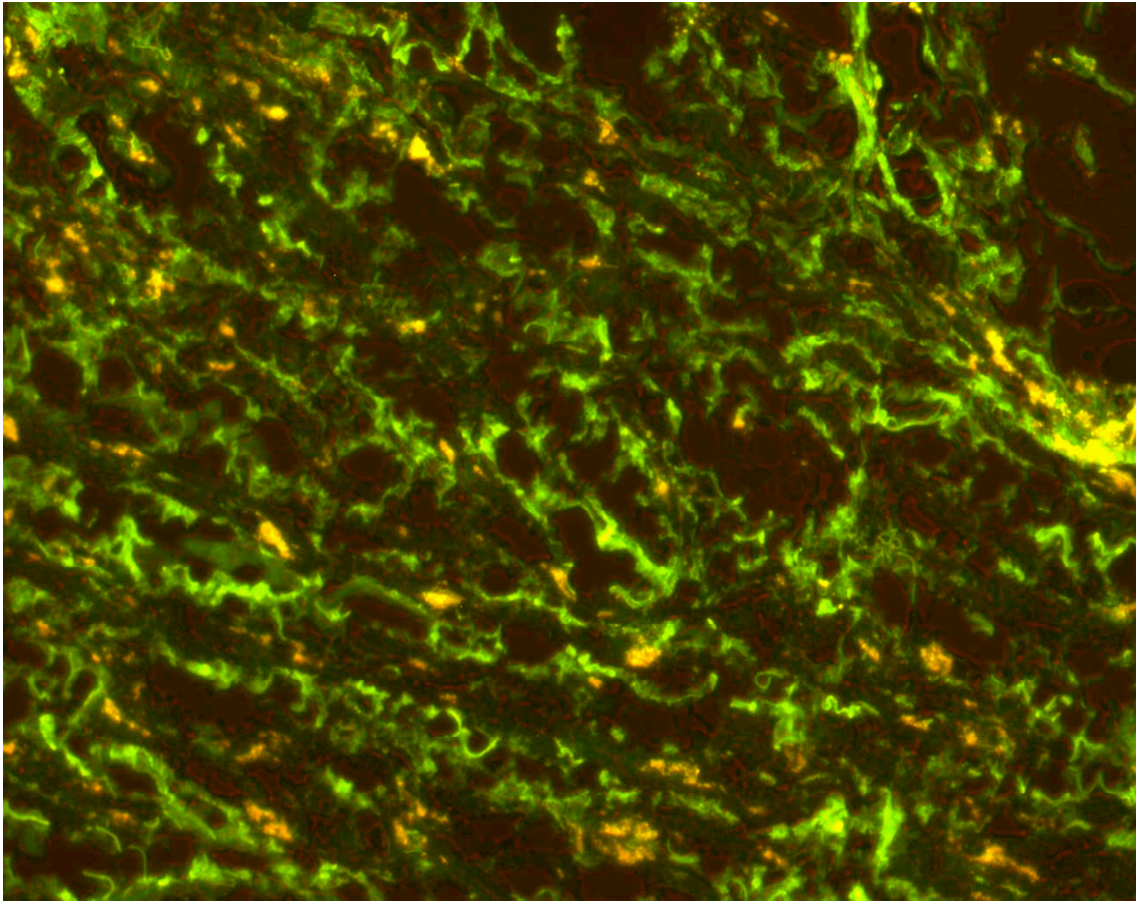


Abb. 3.7: Kardiomyozytenverband, nach 60 min Hypoxie und 20 min Reperfusion, vorherige Kardioplegie-Perfusion, 20fache Vergrößerung, Färbung mit PARP-1 Antikörper, Zellmembran in hellgrün, PARP-1-Antikörper im Zellkern in orange fluoreszierend.

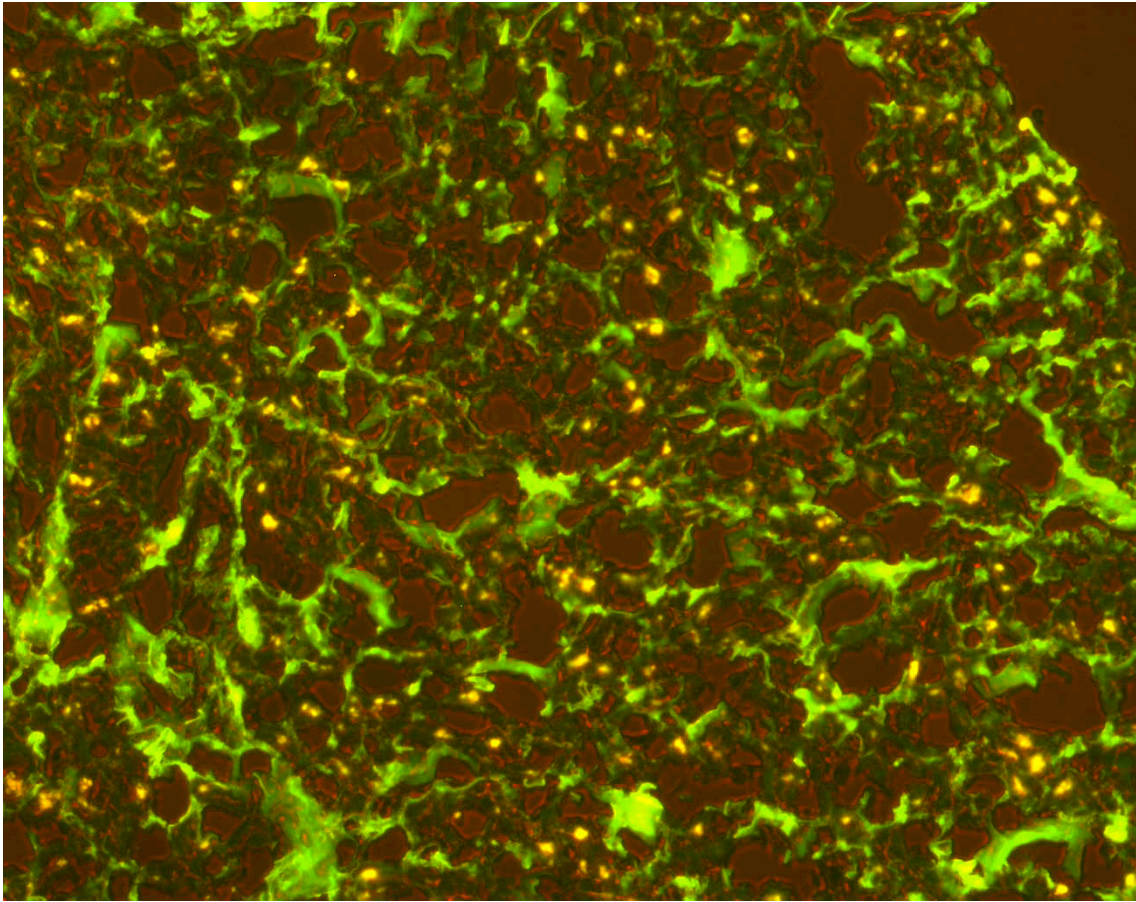


Abb. 3.8: Abbildung eines Kardiomyozytenverbandes nach 60 min Hypoxie und 20 min Reperfusion ohne vorherige Kardioplegie-Perfusion, 20fache Vergrößerung, Färbung mit PARP-1 Antikörper, Zellmembran in hellgrün, PARP-1-Antikörper in orange fluoreszierend.

4 DISKUSSION

4.1 Kardiomyozytenzellverband in vitro

Das Zellmodell, bestehend aus intakten Kardiomyozytenzellverbänden, war strengen Auswahlkriterien (unmittelbare Bearbeitung nach Probenentnahme, Größe von 500 µm, keinerlei Zelldetritus an den Zellverbänden klebend, keine zentralen Gewebeschäden, mehr als 99% vitale zentral gelegene Kardiomyozyten in der Vitalitätsprobe) unterworfen. Somit konnte eine für das menschliche Herzvorhofgewebe repräsentative Gewebszusammensetzung gewährleistet werden.

Dies war die Voraussetzung, um die Ergebnisse mit denen bisheriger Untersuchungen der Calciumhomöostase und Apoptose von Kardiomyozyten in der Literatur vergleichen zu können, wo abgesehen von Papillarmuskelpräparationen überwiegend enzymatisch isolierte Kardiomyozyten untersucht wurden (*Wasser et al., 1997; Zhu et al., 2004; Saini et al., 2005, 2006; Yu et al., 2006; Zang et al., 2006*).

Außerdem wurden bisher in den meisten Studien Kardiomyozyten von Ratten oder Stammzellen verwendet, Untersuchungen mit menschlichen Zellen aus dem Herzohr sind eher in der Minderheit (*Selivanova et al., 1990; Erokhina et al., 1995*).

Bei der Beurteilung des bei dieser Arbeit verwendeten Zellmodells führt man sich den histologischen Aufbau des menschlichen Herzvorhofes vor Augen. Das Herz ist ein muskuläres Hohlorgan, dessen Wände aus drei Schichten (dem Epikard, dem Myokard und dem Endokard) bestehen. Das Myokard besteht wiederum aus Kardiomyozyten, die netzartige Stränge und Bündel bilden und in Schichten angeordnet sind. Die Schichten werden voneinander durch Bindegewebe getrennt. Das relativ dünne Herzvorhofgewebe wird in vivo ü-

berwiegend durch Diffusion ernährt, so dass bei dem oben erwähnten Versuchsaufbau die Versorgung der Kardiomyozyten mittels Perfusion sichergestellt werden konnte.

Dieses Zellmodell lässt im Unterschied zu isolierten Kardiomyozyten die Beurteilung der Interaktion der verschiedenen Strukturen (Kardiomyozyten und Bindegewebe) im Zellverband zu.

Ein Nachteil dieses Modells ist das Verletzungstrauma, das durch die Präparation und Fragmentierung der Zellverbände mit dem Skalpell entsteht. Außerdem waren die untersuchten Zellen Vorhofzellen und stammen nicht aus dem Ventrikel, was hingegen bei Untersuchungen mit Rattenherzen zum Beispiel meist der Fall ist.

4.2 Vitalität der Zellverbände

Die essentielle Voraussetzung für Versuche mit Kardiomyozyten im Zellverband war eine hohe Vitalität im zentralen Bereich des Zellverbandes ($\geq 99\%$). Mittels verschiedener Verfahren konnte diese überprüft werden. Bei durchschnittlicher Vitalität von etwa 95% mussten immer wieder Zellverbände verworfen werden. Insgesamt traten avitale Zellen vor allem in Randbereich nach stattgehabten Trauma durch die Anfertigung der 500 μm messenden Würfel mit dem Skalpell auf. Hier betrug die Anzahl avitaler Zellen bis zu 10%.

Der Vorteil der hier durchgeführten Vitalitätsnachweise war, dass mit Fura-2 AM einerseits eine Prüfung der Intaktheit der Zellmembran, andererseits eine Aktivitätsbestimmung unspezifischer Esterasen möglich war. Diese Methode wurde bereits in Arbeiten von Weinlich et al. 2002 verwendet. Die Überprüfung auf Vitalität kann demnach gleichzeitig direkt nach der Inkubation stattfinden, es entsteht kein Zeitverlust wie bei der Methode mit Trypanblau. Hier erfolgt die Bestimmung der Vitalität der Zellen ebenfalls über die Zellmembranintegrität,

die Kardiomyozyten mussten jedoch noch zusätzlich mit Fluoreszenzfarbstoff inkubiert werden.

Zur Identifizierung avitaler Kardiomyozyten wurden in der Literatur auch Färbungen zur Darstellung der Zellmembranintegrität mit Propidiumjodid (PJ) und 5-hexadecanoylaminofluorescein (HEDAF) (*Hein et al. 2006*), sowie die Messung der LDH-Aktivität (*van der Laarse et al. 1984*) eingesetzt. Da die Kardiomyozyten im Zellverband vorlagen und für die weitere Untersuchung ohnehin hätten mit Fluoreszenzfarbstoff inkubiert werden müssen, wurde die Fluoreszenzmethode zur Überprüfung der Vitalität bevorzugt.

4.3 Inkubation mit Fura-2 AM

Ein großer Vorteil von Fura-2 AM ist, dass es neben der calciumsensitiven Anregungswellenlänge von 340 nm auch eine calciuminsensitive Anregungswellenlänge von 380 nm hat, bei der die Fluoreszenzintensität des Fura-2 AM von Änderungen des intrazellulären Calcium-Gehalts nicht beeinflusst wird.

Diese besondere Eigenschaft des Fura-2 AM wurde bei der Messung des intrazellulären Calciums genutzt, und mit Hilfe der Ratio-Messung konnten Faktoren wie Einflüsse durch Farbstoffausbleichung, eventuellen Farbstoffaustritt aus den Zellen oder Farbstoffkonzentrationsänderungen sowie die Sensitivität der Messapparatur weitestgehend unbeachtet bleiben, da sich die Veränderungen auf beide Wellenlängen gleichermaßen ausgewirkt hätten.

4.4 Die Mikroperfusionskammer – eine Untersuchungsmethode für Kardiomyozyten im Zellverband

Um Kardiomyozyten in ihrer Form als Zellverbände untersuchen zu können, wurde von Weinlich et al. 2002 ursprünglich zur Untersuchung von Duodenalvesikeln entwickelte Mikroperfusionskammer (Mk) verwendet. Mikroperfusi-

onskammern waren in der Vergangenheit bereits für verschiedene Arbeiten entwickelt (*Poyton et al., 1970*) worden und haben sich bis heute bei verschiedensten Zellarten bewährt: Enterozyten, quergestreifte Myozyten, aber auch für Untersuchungen von Bakterien (*Duxbury et al., 1974; Busche et al., 2002; Kraft et al., 2003*).

Im Vergleich zu Studien an isolierten Kardiomyozyten ist die Besonderheit der bei dieser Arbeit verwendeten Mikroperfusionskammer, dass Kardiomyozyten als Zellverband untersucht werden können. Nach der Entnahme und Fragmentierung werden intakte Zellen nicht-invasiv untersucht: Dies gelingt durch die spezielle Fixierung mittels des Kunststoffnetzes. Aufgrund der oben beschriebenen Konstruktion konnten die Kardiomyozytenverbände in der laminaren Strömung vor dem Kunststoffnetz in Schwebelage gehalten werden. Eine konstante Position war außerdem die Voraussetzung für die Messungen mit der Fluoreszenzmikroskopie. Im Gegensatz dazu traten bei zu hohen Perfusionsgeschwindigkeiten (> 3 ml/min) Turbulenzen auf, so dass sich die Zellverbände vor allem in der horizontalen Ebene hin- und herbewegten und weitere Messung mit dem Mikroskop unmöglich wurde. Vertikale Bewegungen traten durch die Beschaffenheit des Netzes in der Mz weniger häufig auf und hatten weniger Einfluss auf Artefaktbildung bei der Aufnahme mit der Kamera.

4.4.1 Grundlagen der Ca-Regulationsmechanismen der KMZ

Bei den Untersuchungen zur Calciumhomöostase bestätigten sich in der Literatur beschriebene Abläufe zur Regulation des Calcium-Haushaltes:

Nach Perfusion mit KH ohne Ca stellte sich der erwartete Calcium-Verlust des Kardiomyozyten durch das Fallen der Ratiokurve dar. Man erwartete aber auch, dass die Ratiokurve nun bei erneuter Calcium-haltiger Perfusion ansteigen und den Ausgangsratiowert wieder erreichen müsste, wenn sie die physiologische Calciumregulation der Kardiomyozyten widerspiegelte. Die Ratiokurve stieg nach Calciumzusatz zunächst an, wie postuliert, was auf eine erste überschießende Calciumaufnahme, wie etwa durch den sarkolemmalen Natrium/Calcium-

Austauscher (NCX), der ja durch extrazelluläres Calcium aktiviert wird (*Bers DM, 1991; Terraccino et al., 1994*), schließen lässt. Im Verlauf sank die Ratiokurve wieder minimal um durchschnittlich 0,01 Ratioeinheiten (siehe Abb. 3.1), was man sich durch eine nachfolgende langsamere endgültige Rückregulation erklären kann, wie zum Beispiel durch die SERCA-2a, die den Hauptmechanismus zur Entfernung von Calcium aus der Zelle in das sarkoplasmatische Retikulum darstellt (*Hasenfuss et al., 1994; Schatzmann et al., 1989*), und durch sarkolemmale Calcium-ATPase (*Caroni et al., 1980*).

Es waren demnach bei dem durchgeführten Grundlagenversuch mehrere regulatorische Systeme beteiligt: Oben beschriebener NCX für den raschen Ausgleich nach Calciumdeprivation und SERCA-2a für Erhaltung des Gleichgewichts innerhalb der Zelle. Aber auch langsam arbeitende Regulationsmechanismen, die an der sarkolemmalen Membran integriert sind, wie zum Beispiel die Calcium-ATPase, die eine hohe Calcium-Affinität besitzt und Calcium unter Energieverbrauch aus der Zelle pumpt, was den langsamen Abfall im zweiten Abschnitt der Ratiokurve nach komplettem Calciumentzug aus dem Perfusat erklären mag.

Dies bedeutet, dass die Kardiomyozyten in dem hier verwendeten Zellmodell über eine regelrechte Calciumregulation verfügen und die Ergebnisse über die Calciumhomöostase mit denen aus der Literatur vergleichbar sind, wo fast ausschließlich isolierte nicht-humane Kardiomyozyten untersucht wurden (*Salameh et al., 2002; Shmist et al., 2005*). Somit war die Brauchbarkeit des Modells für weitere Untersuchungen nachgewiesen.

4.4.2 Temperaturabhängige Beeinflussung der Calciumhomöostase

In der Literatur wird beschrieben, dass sich durch Verminderung der Temperatur der Perfusate die Höhe der Ratiokurve ebenfalls vermindert, was bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen mit Kardioplegie-Perfusion (4°C) eben-

falls zu beobachten war. Parameter wie Viskosität oder pH können dabei eine Rolle spielen (*Oliver et al., 2000*), wodurch sich das beobachtete Phänomen erklären lässt. Es wird außerdem postuliert, dass bei milder Hypothermie weniger Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt wird, was u. a. Arrhythmien vorbeugen kann (*Gambassi et al., 1994*).

Durch Hypothermie werden Enzyme und Ionenpumpen beeinflusst, wodurch der gesamte Energieverbrauch und Stoffwechsel der Zelle vermindert wird. Dies wird im Rahmen kardiochirurgischer Eingriffe genutzt, um Zellen zu schützen: Es wird der Glucose- und Sauerstoffverbrauch vermindert, damit auch Laktat- und Pyruvat Spiegel. Schließlich wird hierbei auch Apoptose inhibiert, die ja ein energieabhängiger Prozess ist. (*Shao et al. 2007*).

Inwiefern die Kardioplegie bei den durchgeführten Experimenten durch ihre inhaltlichen Substanzen (Tab. 2.2) oder durch die Temperatur (4°C) die Ratiokurve so stark zum Fallen brachte (d.h. zu einer Calciumdeprivation führte) und eine erheblich geringere Rate von apoptotischen Zellen in der Anfärbung mit PARP-Antikörper in den Zellkernen hervorrief wäre in weiteren Versuchen noch zu klären.

4.5 Korrelation zwischen Calcium-Ratioveränderungen und Apoptose-Rate bei der PARP-Färbung

Bei den Versuchen mit simultaner Calcium-Messung während Kardioplegiegabe, Hypoxie und Reperfusion zeigte sich ein signifikanter Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration. Dabei stellte sich heraus, je länger Hypoxie- und Reperfusionsphasen ohne vorherige Verabreichung von Kardioplegielösung gehalten wurden, umso stärker war die Calcium-Erhöhung am Ende des Experiments, was auf fehlende Calcium-Rückregulation schließen lässt (Abb. 3.5). Dies wiederum kann als Ausdruck der Zellschädigung im Rahmen der stattgehabten Hypoxie und Reperfusion angesehen werden, die ohne vorherige Kardioplegie-Perfusion signifikant stärker war.

Eine mögliche Erklärung für die erhaltenen Ergebnisse könnte sein, dass, in Analogie zu früheren Studien, längerer Entzug von Calcium aus dem Perfusat zu einer ausgeprägten intrazellulären Calciumdeprivation führt. Der Versuchsaufbau musste jedoch konzeptionell an die Fluoreszenzmikroskopie adaptiert werden, zumal der Zusatz von Calcium in das Perfusat zu einem Ratioanstieg führt. Deshalb wäre es bei Calciumzusatz nicht möglich gewesen, einen zusätzlichen (= den Ratiowert erhöhenden) Effekt der veränderten Versuchsparmeter zu erkennen.

Die Ergebnisse der simultanen Calcium-Messung sind mit denen der Literatur durchaus vergleichbar: Wasser et al. zeigten bereits 1997, dass Hypoxie in Kardiomyozyten zu einem intrazellulären Calcium-Anstieg führt. Dies waren es jedoch Versuche an isolierten Kardiomyozyten, so dass also die Ergebnisse der Versuche mit Zellverbänden bei dieser Arbeit mit den Ergebnissen von Arbeiten mit isolierten Kardiomyozyten übereinstimmen.

Der intrazelluläre Anstieg der Calcium-Konzentration während Hypoxie und Reperfusion und die Frage, welche Faktoren dies verhindern bzw. verstärken können, wurden in zahlreichen Studien untersucht. Zum Beispiel können Calciumantagonisten während Ischämie und Reperfusion Kardiomyozyten vor einem Calcium-overload schützen (*Feng et al., 2004*), oder Lipopolysaccharide schützen bei Serumdeprivation die Calciumkanäle und erhöhen die Überlebensrate der Kardiomyozyten (*Chao et al., 2005*).

Wenn Apoptose ein energieabhängiger Prozess ist, wie kommt es dann zu einer so massiven Erhöhung der Apoptose-Rate bei den nach stattgefundener Hypoxie und Reperfusion untersuchten Zellverbänden im Gegensatz zu den nur nach Hypoxie analysierten? Ein Rolle hierbei spielt sicher der Zeitfaktor: Die Zellverbände, die nach stattgehabter Hypoxie und Reperfusion untersucht wurden hatten „länger Zeit“ für diesen Prozess. Andererseits wurde in der Literatur bestätigt, dass Mitochondrien nach einer Hypoxie-Reperfusionsphase einer Akkumulation von intrazellulären Calcium oder auch Sauerstoffradikalen ausgesetzt sind. Dadurch öffnen sich in der mitochondrialen Membran die „Ca⁺⁺Poren“ (PTP). Daraufhin gerät das Membranpotential aus dem Gleichgewicht und es kommt zu einem Versagen der Energie-Produktion. Hieraus resultiert die Frei-

setzung von Cytochrom C. Cytochrom C aktiviert wiederum eine Reihe von Enzymen der Transkription, wodurch es zur Auflösung und Fragmentierung der DNA kommt und vor allem die Caspase-Kaskade in Gang gesetzt wird. Daher kommt es auch bei Energie-Verarmung der Zelle zu Apoptose, auch wenn dies selbst ein energieabhängiger Prozess ist. Ist jedoch der Energieverlust zu hoch, bewirkt der mitochondriale Calcium-Verlust schlussendlich Nekrose (*Honda et al. 2006*).

Bei der Apoptosedetektion mittels PARP-1, welches als Indikator für den Apoptoseweg durch Caspase-Aktivierung gilt, zeigte sich, dass mit der Dauer der Hypoxie- und Reperfusionsphase die Anzahl an apoptotischen Zellen zunahm, was für eine deutliche Schädigung des Myokards während des Vorgangs spricht.

Auch hier wurden Ergebnisse von anderen Studien zu Hypoxie und Ischämie aus der Literatur bestätigt (*Tanaka et al., 1994; De Moissac et al., 2000; Matsuoka et al., 2002*), die zeigen, dass während Hypoxie eine Caspase-Aktivierung und mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C stattfindet, die Apoptose induzieren. Bei jenen Untersuchungen wurden jedoch keine humanen Kardiomyozyten und auch keine Zellverbände verwendet, so dass die hier vorliegenden Ergebnisse die Methode in ihrer Funktionalität wiederum bestätigen.

Die Zusammenschau der Ergebnisse lässt eine Korrelation zwischen intrazellulärem Calcium-Anstieg und Apoptose-Rate erkennen, wiederum in Abhängigkeit von der Dauer der Ischämie- und Reperfusionsphase und der Frage, ob eine vorherige Verabreichung von Kardioplegie erfolgte. In der Literatur ist beschrieben, dass intrazellulärer Calcium-Anstieg Apoptose induzieren kann (*Wasser et al., 1997; Inverte et al., 2002; Feng et al., 2004*). Dies ist jedoch nicht der einzige Mechanismus, der während Hypoxie und Reperfusion zu Apoptose führt. Durch Hypoxie entstehen zum Beispiel auch Sauerstoffradikale (*Cesseli et al., 2001; Chesley et al., 2000*), die letzten Endes apoptotische Mechanismen auslösen können (*Maulik et al., 1998*). Durch vorherige Kardioplegiegabe oder auch durch Präkonditionierung kann aber der Schaden am Myokard durch Sau-

erstoffradiakle deutlich verringert werden (Maulik et al., 1999; Uchiyama et al., 2004).

Eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration während bzw. nach Hypoxie und Reperfusion spricht für eine Zunahme der Apoptose und kann daher als Maß für ihre Ausprägtheit angesehen werden: sowohl die Calciumkonzentration als auch die Apoptose-Rate stiegen in eigenen Ergebnissen an, je länger die Zellverbände der Hypoxie und Reperfusion ausgesetzt wurden.

Dieses Modell stellt also eine einfache Methode dar, mit der durch nicht-invasive simultane Calciummessung das Apoptoseverhalten bezüglich Ischämie/Hypoxie und Reperfusion beobachtet werden kann, indem eine Korrelation zwischen intrazellulärem Calciumanstieg und Apoptose zu erkennen ist. Umgekehrt zeigt es, dass vitale, nicht-apoptotische Kardiomyozyten zur Calcium-Regulation fähig sind.

4.6 Schlussfolgerung

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit können folgende Schlüsse gezogen werden:

1. Die aus dem rechten Herzohr gewonnenen Kardiomyozyten zeigen im Zellverband *in vitro* die charakteristische Morphologie von Kardiomyozyten, und durch zügige Bearbeitung und schonende mechanische Präparation kann eine hohe Vitalität erreicht werden. Das humane Gewebe beweist sich auch im Zellverband als repräsentatives Myokardmodell und kann mit Studien, bei denen isolierte, meist nicht-humane Zellen untersucht wurden, verglichen werden.
2. Ein Vorteil dieser Methode ist die leichte und schnelle Gewinnung von Zellmaterial während einer routinemäßigen herzchirurgischen Operation. Die unkomplizierte Bearbeitung und der Verzicht auf enzymatische Iso-

lierung der Kardiomyozyten ermöglichen eine hohe Rate an Vitalität der Kardiomyozyten in den Zellverbänden. Ein wichtiger positiver Effekt ist es hierbei, dass man so auf Tierversuche verzichten kann.

3. Die Zellverbände können mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM ausreichend beladen und durch das Nylonnetz in der Mikroperfusionskammer reproduzierbar fixiert werden, so dass eine standardisierte Untersuchung mit dem Fluoreszenzmikroskop realisiert werden kann. Somit sind in den Kardiomyozytenzellverbänden Untersuchungen über die Calcium-Homöostase und ihre Veränderungen möglich.
4. In Bezug auf die Calciumhomöostase während Hypoxie und Reperfusion zeigt sich, dass in dem hier etablierten Zellmodell vergleichbare Ergebnisse erzielt werden können wie beim Tiermodell oder in isolierten Kardiomyozyten früherer Studien: Die Apoptose-Rate nimmt bei längerer Hypoxie- und Reperfusionszeit zu, dem kann durch eine vorherige Perfusion mit Kardioplegie entgegen gewirkt werden. Eine Korrelation zwischen dem Anstieg intrazellulärer Calcium-Konzentration und dem Anstieg der Apoptoseinduktion während Hypoxie und Reperfusion mit und ohne Verabreichung von Kardioplegie kann dargestellt werden. Somit wird erkennbar, dass sich dieses Zellmodell zur Untersuchung physiologischer und pathophysiologischer Prozesse eignet.
5. Anders als in vorherigen Untersuchungen konnten Kardiomyozyten im Zellverband also als funktionale Einheit untersucht werden, was bei isolierten Zellen nicht möglich ist. Daher kann man die Ergebnisse der Untersuchungen, welche in vitro entstanden, auf die Situation in vivo übertragen, in der die Kardiomyozyten als eine Art Zellverband angesehen und interpretiert werden können.

Mit dieser hier etablierten Methode könnte man weitere pathophysiologische Erkenntnisse über Kardiomyozyten im Zellverband erlangen und damit zur Auf-

klärung von Erkrankungen des Myokards vor allem auch hinsichtlich Ischämie, Reperfusion und der damit zusammenhängenden Apoptose beitragen. In einer anderen Arbeit im gleichen Labor konnte bereits gezeigt werden, dass zusätzliche Verabreichung von Carvedilol, einem nicht-selektivem β_1 - und β_2 -Blocker, einen noch höheren signifikanten anti-apoptotischen Effekt hat als die alleinige Perfusion mit Kardioplegie vor Hypoxie und Reperfusionsphasen.

Man könnte die Versuche also noch durch Verabreichung pharmakologischer Substanzen und Untersuchung deren anti-apoptotischen Effekt ausweiten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Inhalt dieser Arbeit war es ein dem Herzmuskelgewebe kongruentes humanes Myokardmodell zu entwickeln und damit fluoreszenzmikroskopisch die intrazellulären Calciumregulationsmechanismen und ihre Rolle beim Reperfusionsschaden bzw. der Apoptoseinduktion zu untersuchen.

Dazu wurde eine spezielle Mikroperfusionskammer eingesetzt, in der die Kardiomyozytenzellverbände durch ein Kunststoffnetz schonend fixiert werden konnten. Für eine simultane Untersuchung von mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen und nicht beladenen Zellverbänden wurde eine doppelt gekammerte Mikroperfusionskammer entwickelt, in der für die beiden gleichzeitig perfundierten Zellverbände die selben Verhältnisse herrschten.

Die Untersuchung der Calciumhomöostase erfolgte zunächst unter Perfusion mit Calcium-haltiger und Calcium-freier Krebs-Henseleit-Lösung. Anschließend wurden Hypoxie- und Reperfusions-Versuche unter Kühlung und Stickoxyd- bzw. Carbogenbegasung durchgeführt. Hierbei erfolgte eine Einteilung in verschiedene Gruppen (Kardioplegie/Hypoxie/Reperfusion, Hypoxie/Reperfusion). Dabei befanden sich in dem unteren Teil der Mikroperfusionskammer nicht mit Fluoreszenzfarbstoff beladene Zellverbände. Diese wurden anschließend zu Kryoschnitten verarbeitet, auf Objekträger aufgebracht und immunhistochemisch mit PARP-1-Antikörpern ((Anti-Poly-ADP-Ribose)-Polymerase-1) auf stattgehabte Apoptose untersucht.

Verwendet wurde für die Untersuchungen der Calciumregulation Fura-2 AM. Dies ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der neben der calciumsensitiven Anregungswellenlänge von 340 nm auch eine calciuminsensitive Anregungswellenlänge von 380 nm hat, bei der die Fluoreszenzintensität des Fura-2 AM von Änderungen des intrazellulären Calcium-Gehalts nicht beeinflusst wird. Emissionswellenlänge ist jeweils 510 nm. Aus dem Verhältnis der gemessenen Fluoreszenzin-

tensitäten wurde das Ratio $R = \text{calciumsensitiv}_{340\text{nm}} / \text{calciuminsensitiv}_{380\text{nm}}$ berechnet. So konnten Störfaktoren bei der Untersuchung der Calciumregulation der Kardiomyozytenzellverbände minimiert werden.

Bei den Grundlagenversuchen ($N = 10$) bestand bei den Kardiomyozyten eine intakte Calciumhomöostase: Nach Calcium-Entzug wurde ein Fallen der Ratio-kurve um $0,15 \pm 0,04$ Ratioeinheiten beobachtet, sie stieg nach Calciumgabe wieder an und erreichte dann ihren Ausgangswert von $1,60 \pm 0,05$ Ratioeinheiten wieder, hier $\Delta\text{Ratio} = \text{Ratiowert}_{\text{Versuchsende}} - \text{Ratiowert}_{\text{Versuchsanfang}} \leq 0,01$.

Die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Calcium-Messung ($N = 60$) zeigen, dass mit der Dauer der Hypoxie- und Reperfusionsphase ohne vorherige Perfusion mit Kardioplegielösung $\Delta\text{Ratio} = \text{Ratiowert}_{\text{Versuchsende}} - \text{Ratiowert}_{\text{Versuchsanfang}}$ signifikant anstieg: 20/7 min Hypoxie/Reperfusion $\Delta\text{Ratio} = 0,06$, 40/13 min Hypoxie/Reperfusion $\Delta\text{Ratio} = 0,15$ und 60/20 min Hypoxie/Reperfusion $\Delta\text{Ratio} = 0,25$ (hierfür $p < 0,05$). Im Gegensatz hierzu ergab sich bei gleichen Hypoxie- und Reperfusionszeiten jedoch mit Kardioplegiegabe jeweils ein $\Delta\text{Ratio} \leq 0,02$ ohne signifikanten Calcium-Anstieg am Ende der Untersuchungen ($p < 0,05$). Dies spricht dafür, dass in den Gruppen ohne Kardioplegie die Calciumrückregulation nicht mehr intakt ist und dies als Ausdruck der Zellschädigung angesehen werden kann.

Die Anzahl an apoptotischen Zellen in der PARP-Färbung nahm gleichermaßen zu: In den Versuchen ohne vorherige Kardioplegie-Perfusion waren insgesamt bei 20/7 min Hypoxie/Reperfusion 21,9%, nach 40/13 min Hypoxie/Reperfusion 40,3% und nach 60/20 min Hypoxie/Reperfusion 57,9% der Zellen apoptotisch, während es in den Gruppen mit Kardioplegie $\leq 15,6\%$ (bei 60/20 min Hypoxie/Reperfusion) zu einem signifikant geringeren Anteil apoptotischer Zellen kam ($p < 0,05$). Dies lässt auf eine Korrelation zwischen Δ -Ratio und Anzahl apoptotischer Zellen pro Gesichtsfeld schließen.

Es ergab sich somit eine zeitabhängige Zunahme der Apoptose-Rate bei Hypoxie/Reperfusion in den PARP Untersuchungen, die mit einem Calcium-Overload

in den Perfusionsuntersuchungen korrelierte. Dies konnte durch vorherige Gabe von Kardioplegie signifikant vermindert werden.

Zusammenfassend lässt sich aus dieser Pilotuntersuchung schließen, dass das in dieser Arbeit entwickelte Versuchsmodell mit einer Mikroperfusionskammer und einem angepassten Perfusionssystem zur Untersuchung von Physiologie, Pathophysiologie sowie Apoptose nach Hypoxie und Reperfusion bei Kardiomyozyten im Zellverband geeignet ist und weitere Erkenntnisse darüber liefern könnte.

6 LITERATUR

Aebert H, Kirchner S, Keyser A, Birnbaum DE, Holler E, Andreesen R, Eissner G (2000)

Endothelial apoptosis is induced by serum of patients after cardiopulmonary bypass.

Eur J Cardiothorac Surg. 18: 589-593

Adderley SR, Fitzgerald DJ (2000)

Glycoprotein IIb/IIIa antagonists induce apoptosis in rat cardiomyocytes by caspase-3 activation.

J Biol Chem. 275: 5760-5766

Aikawa R, Nawano M, Gu Y, Katagiri H, Asano T, Zhu W, Nagai R, Komuro I (2000)

Insulin prevents cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis through activation of PI3 kinase/Akt.

Circulation. 102: 2873-2879

Amarante-Mendes GP, Finucane DM, Martin SJ, Cotter TG, Salvesen GS, Grenn DR (1998)

Anti-apoptotic oncogenes prevent caspase-dependent and independent commitment for cell death.

Cell Death Differ. 5: 298-306

Angelos MG, Kutala VK, Torres CA, He G, Stoner JD, Mohammad M, Kuppusamy P (2006)

Hypoxic reperfusion of the ischemic heart and oxygen radical generation.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 290(1):H341-347

Aoki H, Sadoshima J, Izumo KS (2000)

Myosin light chain kinase mediates sarcomere organization during cardiac hypertrophie in vitro.

Nature Med. 6: 183-188

Asanuma H, Minamino T, Sanada S, Takashima S, Ogita H, Ogai A, Asakura M, Liao Y, Asano Y, Shintani Y, Kim J, Shinozaki Y, Mori H, Node K, Kitamura S, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M (2004)

Beta-adrenoceptor blocker carvedilol provides cardioprotection via an adenosine-dependent mechanism in ischemic canine hearts.

Circulation. 109(22): 2773-9.

Ashkenazi A, Dixit VM (1998)

Death receptors: signalling and modulation.

Science. 281: 1305-1308

- Bandyopadhyay A, Shin DW, Ahn JO et al. (2000)
Calcineurin regulates ryanodine receptor/Ca²⁺-release channels in rat heart.
Biochem J. 352: 61-70
- Bassani JW, Yuan W, Bers DM (1995)
Fractional SR Ca release is altered by trigger calcium and SR Ca content in cardiac myocytes.
Am J Physiol. 268: C1313-C1319
- Bers DM (1991)
Ca regulation in cardiac muscle.
Med Sci Sports Exerc. 23: 1157-1162
- Bers DM (1993)
Natrium/calcium Exchange and sarcolemmal Calcium-Pump Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force.
No Chapter. 5: 71-92
- Bers DM (2002)
Cardiac excitation-contraction coupling.
Nature. 415: 198-205
- Bialik S, Cryns VL, Drincic A, Miyata S, Wollowick AL, Srinivasan A, Kitsis RN (1999)
The mitochondrial apoptotic pathway is activated by serum and glucose deprivation in cardiac myocytes.
Circ res. 85(5): 403-414
- Bisognano JD, Weinberger HD, Bohlmeier TJ, Pende A, Reynolds MV, Sasthava A, Roden R, Asano K, Blaxall BC, Wu SC, Communal C, Singh K, Colussi W, Bristow MR, Port DJ (2000)
Myocardial directed overexpression of the human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice.
J Mol Cell Cardiol. 32(5): 817-830
- Blinks JR, Endoh M (1986)
Modification of myofibrillar responsiveness to Calcium as an inotropic mechanism.
Circulation. 73(suppl III): 85-97
- Boxberger HJ, Meyer TF, Grausam M, Reich K, Becker, H.D. and Sessler, M.J. (1997)
A novel method for isolating and maintaining highly polarized primary epithelial cells from normal human duodenum for growth as spheroid-like vesicles.
In vitro cellular and developmental Biology. 33(7): 536-545
- Busche R, Bartels J, Kirschberger S, von Engelhardt W (2002)

Intracellular pH regulation in guinea-pig caecal and colonic enterocytes during and after loading with short-chain fatty acids and ammonia.

Pflugers Arch. 444: 785-794

Cameron AM, Steiner JP, Roskams AJ et al. (1995)

Calcineurin associated with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Ca²⁺ flux.

Cell. 83: 463-472

Carafoli E (1985)

The homeostasis of calcium in heart cells.

J Moll Cell Cardiol. 17: 203-212

Caroni P, Carafoli E (1980)

An ATP-dependent calcium-pumping system in dog heart sarcolemma.

Nature. 283: 765-767

Chao W, Shen Y, Zhu X, Zhao H, Novikov M, Schmidt U, Rosenzweig A (2005)

Lipopolysaccharide improves cardiomyocytes survival and function after serum deprivation.

J Biol Chem. 280: 21997-22005

Chen J, Henderson GI, Freeman GL (2001)

Role of 4-hydroxynonenal in modification of cytochrome c oxidase in ischemia/reperfused rat heart.

J Mol Cell Cardiol. 33(11): 1919-1927

Chen M, Xiao CY, Hashizume H, Abiko Y (1997)

Differential effects of Ca²⁺ channel blockers on Ca²⁺ overload induced by lysophosphatidylcholine in cardiomyocytes.

Eur J Pharmacol. 333: 261-268

Chen M, He H, Zhan S, Krajewski S, Reed JC, Gottlieb RA (2001)

Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion.

J Biol Chem. 276(33): 30724-30728

Cheng W, Li B, Kajstura J, Li P, Wolin MS, Sonnenblick EH, Hintze TH, Olivetti G, Anversa P (1995)

Stretch-induced programmed myocyte cell death.

J Clin Invest. 96: 2247-2259

Chesley A, Lundberg MS, Asai T, Xiao RP, Ohtani S, Lakatta EG, Crow MT (2000)

The β_2 -adrenergic receptor delivers an apoptotic signal to cardiac myocytes through G_i-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-Kinase.

Circ Res. 89: 201-210

Cesselli D, Jakoniuk I, Barlucci L, Beltrami AP, Hintze TH, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P (2001)

Oxidative stress-mediated cardiac cell death is a major determinant of ventricular dysfunction and failure in dog dilated cardiomyopathy.

Circ Res. 89: 279-286

Communal C, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS (1999)

Opposing effects of β 1- and β 2-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis: a role of a pertussis sensitive G protein.

Circulation. 100: 2210-2212

De Moissac D, Gurevich RM, Zheng H, Singal PK, Kirshenbaum LA (2000)

Caspase activation and mitochondrial cytochrome C release during hypoxia-mediated apoptosis of adult ventricular myocytes.

J Mol Cell Cardiol. 32(1): 53-63

Duxbury T (1977)

A microperfusion chamber for studying the growth of bacterial cells.

J Appl Bacteriol. 43: 247-251

Ekhterae D, Lin Z, Lundberg MS, Crow MT, Brosius FC 3rd, Nunez G (1999)

ARC inhibits cytochrome c release from mitochondria and protects against hypoxia-induced apoptosis in heart-derived H9c2 cells.

Circ Res. 85: 70-77

Erokhina IL, Selivanova GV, Vlasova TD, Emelianova OI, Soroka VV (1995)

Cytophotometric, morphometric and electron microscopic studies of the cardiomyocytes of the human atrium in the ischemic heart disease.

Tsitologija. 37: 291-297

Feng QZ, Li DT, Wang ZX, Yi J, Wang L, Yang TS (2004)

Effects of Ca²⁺ antagonists on cardiomyocytic apoptosis after experimental myocardial infarction.

Zhongguo Wie Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue. 16(3): 133-136

Freude B, Masters TN, Robiczek F, Fokin A, Kostin S, Zimmermann R, Ullmann C, Lorenz-Meyer S, Schaper J (2000)

Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reoxygenation.

J Mol Cell Cardiol. 32(2): 197-208

Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN, Walsh K (2000)

Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart.

Circulation. 101(6): 660-667

Gambassi G, Cervai E, Pahor M, Capogrossi MC, Carbonin P, Mugelli A (1994)

Temperature modulates calcium homeostasis and ventricular arrhythmias in myocardial preparations.

Cardiovasc Res. 28: 391-399

Geertman R, McMahon M, Shabban EL (1996)

Cloning and characterization of cDNAs for novel proteins with glutamic acid-proline dipeptide tandem repeats.

Biochim Biophys Acta. 1306: 147-152

Gruver CL, Demayo F, Goldstein MA et al. (1993)

Targeted developmental overexpression of calmodulin induces proliferate and hypertrophic growth of cardiomyocytes in transgenic mice.

Endocrinology. 133: 376-388

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985)

A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties.

J Biol Chem. 260: 3440-3450

Gu Y, Zou Y, Aikawa R, Hayashi D, Kudoh S, Yamauchi T, Uozumi H, Zhu W, Kadowaki T, Yazaki Y, Komuro I (2001)

Growth hormone signalling and apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes.

Mol Cell Biochem. 223: 35-46

Gustafsson AB, Sayen MR, Williams SD, Crow MT, Gottlieb RA (2002)

TAT protein transduction into isolated perfused hearts: TAT-apoptosis repressor with caspase recruitment domain is cardioprotective.

Circulation. 106: 735-739

Györke I, Györke S (1998)

Regulation of the cardiac ryanodine receptor channel by luminal Ca²⁺ involves luminal Ca²⁺ sensing sites.

Biophys J. 75: 2801-2810

Hain J, Onoue H, Mayrleitner et al. (1995)

Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle.

J. Biol. Chem. 270: 2074 – 2081

Hardinham GE, Bading H (1998)

Nuclear calcium: a key regulator of gene expression.

Biometalls. 11: 345-358

Hasenfuss G, Holubarsch C, Hermann H-P, Astheimer K, Pieske B, Just H (1994)

Influence of the force-frequency relationship on haemodynamics and left ventricular function in patients with non-failing hearts and in patients with dilated cardiomyopathy.

Europ Heart J. 11645: 170

Hein S, Kostin S, Schaper J. (2006)

Adult rat cardiac myocytes in culture: 'Second-floor' cells and coculture experiments.

Exp Clin Cardiol. 11(3):175-182

Herceg Z, Wang ZQ. (1999)

Failure of poly (ADP-ribose) polymerase cleavage by caspases leads to induction of necrosis and enhanced apoptosis.

Mol Cell Biol. 19: 5124-5133

Hess P (1988)

Elementary properties of cardiac calcium channels: a brief review.

Physiol Pharmacol. 66: 1218-1223

Hilgemann DW, Collins A, Matsuoka S (1992)

Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange: secondary modulation by cytoplasmic calcium and ATP.

J Gen Physiol. 100: 933-961

Holleymann CR, Larson DF (2001)

Apoptosis in the ischemic reperfused myocardium.

Perfusion. 16(6): 491-502

Honda HM, Ping P (2006)

Mitochondrial permeability transition in cardiac cell injury and death.

Cardiovasc Drugs Ther. 20(6): 425-32

Hotta Y, Ishikawa N, Ohashi N, Matsui K(2001)

Effects of SM-20550, a selective Na⁺/H⁺ exchange inhibitor, on the ion transport of myocardial mitochondria.

Mol Cell Biochem. 219 (1-2): 83-90

Inserte J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Padilla F, Barrabes JA, Pina P, Agullo L, Piper HM, Soler-Soler J (2002)

Effect of inhibition Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death.

Cardiovasc Res. 55(4): 739-748

Isenberg, J.I., Ljungström M., Säfsten, B and Flemström, G (1993)

Proximal duodenal enterocyte transport: evidence for Na⁺-H⁺ and Cl⁻-HCO₃⁻ exchange and NaHCO₃ cotransport.

Am. J. Physiol., 265: G677-G685

Iwai-Kanai E, Hasegawa K, Araki M, Kakita T, Morimoto T, Sasayama S (1999)

Alpha- and beta-adrenergic pathways differentially regulate cell type-specific apoptosis in rat cardiac myocytes.

Circulation. 100(3): 305-311

Janczewski AM, Lakatta EG (1993)

Buffering of calcium influx by sarcoplasmic reticulum during the action potential in guinea-pig ventricular myocytes.

J of Physiol. 471: 343-363

Kang PM, Haunstetter A, Aoki H, Usheva A, Izumo S (2000)

Morphological and molecular characterization of adult cardiomyocyte apoptosis during hypoxia and reoxygenation.

Circ Res. 87(2): 118-25

Karczewski P, Kuschel M, Baltas LG, Bartel S, Krause EG (1997)

Site-specific phosphorylation of a phospholamban peptide by cyclic nucleotide- and calcium calmodulin-dependent protein kinases of cardiac sarcoplasmic reticulum.

Bas Res Cardiol. 92 (Suppl 1): 37-43

Kauffmann RF, Taylor RW, Pfeiffer DR (1980)

Cation transport and specificity of ionomycin. Comparison with ionophore A23187 in rat liver mitochondria.

J Biol Chem. 255: 2735-2739

Kauffmann SH, Hengartner MO (2001)

Programed cell death: alive and well in the new millennium.

Cell Biology. 11: 526-534

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972)

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.

Br J Cancer. 26(4): 239-257

Koseki T, Inohara N, Chen S, Nunez G (1998)

ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases.

Proc Natl Acad Sci USA. 95: 5156-5160

Kraft CN, Diedrich O, Burian B, Schmitt O, Wimmer MA (2003)

Microvascular response of striated muscle to metal debris. A comparative in vivo study with titanium and stainless steel.

J Bone Joit Surg Br. 85: 133-141

Krown KA, Page MT, Nguyen C, Zechner D, Gutierrez V, Comstock KL, Glembotski CC, Quintana PJ, Sabbadini RA (1996)

Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death.

J Clin Invest. 98: 2854-2865

Landgraf G, Gellerich FN, Wussling MH (2004)

Inhibitors of SERCA and mitochondrial Ca-uniporter decrease velocity of calcium waves in rat cardiomyocytes.

Mol Cell Biochem. 256-257: 379-386

Lee P, Sata M, Lefer DJ, Factor SM, Walsh K, Kitsis RN (2003)

Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 284: H456-463

Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M (1990)

Elevated circulation levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure.

N Engl J Med. 323: 236-241

Levitsky DO, Nicoll DA, Philipson KD (1994)

Identification of the high affinity calcium-binding domain of the cardiac sodium-calcium exchanger.

J Biol Chem. 269: 22847-22852

Lewartowski B, Rozycha M, Janiak R (1994)

Effects of thapsigargin in normal and pretreated with ryanodine receptor guinea pig cardiomyocytes.

Am J Physiol. 266: H1829-H1839

Lewis CS, Felix K, Caswell A, Brandt N, Ball W, Vaghy PL, Meissner G, Ferguson DG (1995)

Immunolocalization of sarcolemmal dihydropyridine receptor and sarcoplasmic reticular triad and ryanodine receptor in rabbit ventricle and atrium.

J Cell Biol. 29: 673-682

Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998)

Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis.

Cell. 94(4): 491-501

Li P, Li J, Muller E, Otto A, Dietz R, von Harsdorf R (2002)

Phosphorylation by protein kinase CK2. A signaling switch for the caspase-inhibiting protein ARC.

Mol Cell. 10: 247

Liu C, Hermann TE (1978)

Characterization of ionomycin as a calcium ionophore.

J Biol Chem. 253: 5892-5894

- Liu WC, Slusarchyk DS, Astle G, Trejo WH, Brown WE, Meyers E (1978)
Ionomycin, a new polyether antibiotic.
J Antibiot (Tokyo). 31: 815-819
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996)
Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome-c.
Cell. 86: 147-157
- Lokuta AJ, Rogers TB, Lederer WJ et al. (1995)
Modulation of the cardiac ryanodine receptor of swine and rabbit by a phosphorylation-dephosphorylation mechanism.
J. Physiol (London). 487: 609-622
- Los M, Mozoluk M, Ferrari D (2002)
Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling.
Mol Biol Cell. 13: 978-988.
- Lukyanenko V, Györke I, Györke S (1996)
Regulation of calcium release by calcium inside the sarcoplasmic reticulum in ventricular myocytes.
Pfluegers Arch Eur J Physiol. 432: 1047-1054
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998)
Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors.
Cell. 94(4): 481-490
- Malhotra R, Brosius FC 3rd (1999)
Glucose uptake and glycolysis reduce hypoxia-induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiac myocytes.
J Biol Chem. 274(18): 12567-12575
- Mann DL (2003)
Stress-activated cytokines and the heart: From adaptation to maladaptation
Annu Rev Physiol. 65: 81-101
- Marx SO, Reiken S, Hismatsu Y et al. (2000)
PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts.
Cell. 101: 365-376
- Matsuoka R, Ogawa K, Yaoita H, Naganuma W, Maehara K, Maruyama Y (2002)
Characteristics of cell death of neonatal rat cardiomyocytes following hypoxia-reoxygenation: the association of apoptosis and cell membrane integrity.

Heart Vessels. 16: 241-248

Matsuoka S, Nicoll DA, Hryshko LV, Levitsky DO, Weiss JN, Philipson KD (1995)

Regulation of the cardiac sodium-calcium exchanger by calcium: mutation analysis of the calcium-binding domain.

J Gen Physiol. 105: 403-420

Mattiuzzi A, Hove-Madsen L, Bers DM (1995)

Protein kinase inhibitors reduce SR Ca transport in permeabilized cardiac myocytes.

Am J Physiol. 267: H812-H820

Maulik N, Yoshida T, Das DK (1998)

Oxidative stress developed during the reperfusion of ischemic myocardium induces apoptosis.

Free Radic Biol Med. 24: 869-875

Maulik N, Sasaki H, Galang N (1999)

Differential regulation of apoptosis by ischemia-reperfusion and ischemic adaptation.

Ann N Y Acad Sci. 874: 401-411

McDonough PM, Glembotski CC (1992)

Induction of natriuretic factor and myosin light chain-2 gene expression in cultured ventricular myocytes by electrical stimulation.

J Biol Chem. 267: 11665-11668

Molentkin JD (2000)

Calcineurin and beyond: cardiac hypertrophic signaling.

Circ Res. 87: 731-738

Morano I, Bachle-Stolz C, Katus HA et al. (1985)

Increased calcium sensitivity of chemically skinned human atria by myosin light chain kinase.

FEBS Lett. 189: 221-224

Morgan AJ, Jacob R (1994)

Ionomycin enhances Ca²⁺ influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane.

Biochem J. 200: 665-672

Narula J, Pandey P, Arbustini E, Haider N, Narula N, Kolodgie FD, Dal Bello B, Semigran MJ, Bielsa-Masdeu A, Dec GW, Israels S, Ballester M, Saxena S, Kharbanda S (1999)

Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy.

Proc Natl Acad Sci USA. 96: 7614-7616

Nakamura T, Mizuno S, Matsumoto K, Sawa Y, Matsuda H (2000)
Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF.

J Clin Invest. 106: 1511-1519

Neuss M, Monticone R, Lundberg MS, Chesley AT, Fleck E, Crow MT (2001)
The apoptotic regulatory protein ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain) prevents oxidant stress-mediated cell death by preserving mitochondrial function.

J Biol Chem. 276: 33915-33922

Nimer LR, Needleman DH, Hamilton SL, Krall J, Movesian MA (1995)
Effect of ryanodine on sarcoplasmic reticulum calcium accumulation in non-failing and failing human myocardium.

Circulation. 92: 2504-2510

Oliver AE, Baker GA, Fugate RD, Tablin F, Crowe JH (2000)
Effects of temperature on calcium-sensitive fluorescent probes.

Biophys J. 78: 2116-2126

Olson EN, Schneider MD (2003)

Sizing up the heart: development redux in disease.

Genes & Dev. 17: 1937-1956

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P (2003)

Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link.

Nat Rev Mol Cell Biol. 4(7): 552-565

Pang Y, Hunton DL, Bounelis P, Marchase RB (2002)

Hyperglycemia inhibits capacitative calcium entry and hypertrophy in neonatal cardiomyocytes.

Eur J Pharmacol. 456 (1-3): 59-68

Passier R, Zeng H, Frey N et al. (2000)

CaM kinase signalling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo.

J. Clin Invest. 105: 1395-1406

Peng CF, Lee P, DeGuzman A, Miao W, Chandra M, Shirani J, Factor S, Laffer D, Condorelli G, Ardati A, Della Penna K, Zinkel S, Korsmeyer SJ, Treppe G, Zilberstein A, Kitsis RN (2001)

Multiple independent mutations in apoptotic signalling pathways markedly decrease infarct size due to myocardial ischemia-reperfusion.

Circulation. 104: II-187

Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L et al. (2001)

Sodium-Calcium exchange contributes to mechanical dysfunction and triggered arrhythmias in heart failure.

Circ Res. 88: 1159-1167

Poyton RO, Brabton D (1970)

A multipurpose microperfusion chamber.

Exp Cell Res. 60: 109-114

Rabkin SW, Huber M, Krystal G (1999)

Modulation of palmitate-induced cardiomyocyte cell death by interventions that alter intracellular calcium.

Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 61: 195-201

Rathi SS, Saini HK, Xu YJ, Dhalla NS (2004)

Mechanisms of low Na⁺-induced increase in intracellular calcium in KCl-depolarized rat cardiomyocytes.

Mol Cell Biochem. 263: 151-162

Redwood SR, Ferrari R, Marber MS (1998)

Myocardial hibernation and stunning: from physiological principles to clinical practice.

Heart. 80: 218-222.

Rohwedel J., Guan K., Wobus A.M (1999)

Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro.

Cells tissues organs. 165: 190-202

Saini, HK, Dhalla NS (2005)

Defective calcium handling in cardiomyocytes isolated from hearts subjected to ischemia-reperfusion.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 288: H2260-H2270

Salameh A, Dhein S, Beuckelmann DJ (2002)

Role of the cardiac Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾exchanger in [Ca⁽²⁺⁾]_i and [Na⁽⁺⁾]_i handling during intracellular acidosis. Effect of cariporide (Hoe 642).

Pharmacol Res. 45: 35-41

Scarabelli TM, Stephanou A, Pasini E, Comini L, Raddino R, Knight RA, Latchman DS (2002)

Different signaling pathways induce apoptosis in endothelial cells and cardiac myocytes during ischemia/reperfusion injury.

Circ Res. 90(6): 745-748

Schafer C, Ladilov Y, Inserte J, Schafer M, Haffner S, Garcia-Dorado D, Piper HM (2001)

Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca⁺ exchanger in reoxygenation induced cardiomyocyte injury.

Cardiovasc Res. 51(2): 24-50

- Scharff R, Wool IG. (1965)
Accumulation of amino acids in muscle of perfused rat heart. Effect of insulin.
Biochem J. 97(1): 257-271.
- Schatzmann HJ (1989)
The calcium pump of the surface membrane and of the sarcoplasmic reticulum.
Ann Rev Physiol. 51: 473-485
- Schmitt JP, Schröder J, Schunkert H, Birnbaum DE, Aebert H (2002)
Role of Apoptosis in Myocardial Stunning After Open Heart Surgery
Ann Thorac Surg. 73: 1229-1235
- Schwarz ER, Kersting PH, Reffelmann T, Meven DA, Al-Dashti R, Skobel EC, Klosterhalfen B, Hanrath P (2003)
Cardioprotection by Carvedilol: antiapoptosis is independent of beta-adrenoceptor blockage in the rat heart.
J Cardiovasc Pharmacol Ther. 8(3): 207-15
- Selivanov VA, Ichas F, Holmuhamedov EL, Jouaville LS, Evtodienko YV, Mazat JP (1998)
A model of mitochondrial Ca²⁺-induced Ca²⁺ release simulating the Ca²⁺ oscillations and spikes generated by mitochondria.
Biophys Chem. 72(1-2):111-21.
- Selivanova GV, Vlasova TD (1990)
A cytophotometric comparison of the age-related changes in the DNA and protein content in human atrial cardiomyocytes in heart diseases.
Tsitologija. 32: 704-711
- Siegmund B, Zude R, Piper HM (1992)
Recovery of anoxic-reoxygenated cardiomyocytes from severe Ca²⁺ overload.
Am J Physiol. 263: H1262-H1269
- Silver RB (1998)
Ratio imaging: practical considerations for measuring intracellular calcium and pH in living tissue.
Methods Cell Biol. 56: 237 - 251
- Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Iyer S (1998)
Transient poly (ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins and role of poly (ADP-ribose) polymerase in the early stages of apoptosis.
J Biol Chem. 273: 13703-13712
- Shao ZH, Chang WT, Chan KC, Wojcik KR, Hsu CW, Li CQ, Li J, Anderson T, Qin Y, Becker LB, Hamann KJ, Vanden Hoek TL. (2007)

Hypothermia-induced cardioprotection using extended ischemia and early reperfusion cooling.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 292(4):H1995-2003

Sheng Z, Knowlton K, Chen J, Hishijima M, Brown JH, Chien KR (1997)
Cardiotrohin 1 (CT1) inhibition of cardiac myocyte apoptosis via mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. Divergence from downstream activated CT-1 signals for myocardial cell hypertrophy.

J Biol Chem. 272: 5783-5791

Shier WT, Angerhofer CK, Dubourdieu DJ (1987)

Role of stress in the initial injury stages of cell killing by altered intracellular calcium.

Toxicol Lett. 39: 283-293

Shmist YA, Kamburg R, Ophir G, Kozak A, Shneyvays V, Appelbaum YJ, Shainberg A (2005)

N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)-ethylenediamine improves myocardial protection against ischemia by modulation of intracellular Ca²⁺ homeostasis.

J Pharmacol Exp Ther. 313: 1046-1057

Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnenri ES, Green DR, Martin SJ (1999)

Ordering cytochrome-c initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases -2, -3, -7, -8. and -10 in a caspase-9-dependent manner.

J Cell Biol. 144: 281-292

Sun HY, Wang NP, Kerendi F, Halkos M, Kin H, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ (2005)

Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload.

AM J Physiol Heart Circ Physiol. 288: H1900-H1908

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Constantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebbersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999)

Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor.

Nature. 397(6718): 441-446

Tahara S, Fukuda K, Kodama H, Kato T, Miyoshi S, Ogawa S (2001)

Potassium channel blocker activates extracellular signal-regulated kinases through Pyk2 and epidermal growth factor in rat cardiomyocytes.

J AM Coll Cardiol. 38: 1554-1563

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

Tanneur V, Ilgaz D, Durantou C, Fillon S, Gamper N, Huber SM, Lang F (2002)

Time-dependent regulation of capacitative Ca²⁺ entry by IGF-1 in human embryonic kidney cells.

Pflugers Arch. 445(1): 74-79

Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, Dawson AP (1990)

Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase.

Proc Natl Acad Sci USA. 87: 2466-2470

Thome M, Tschopp J (2001)

Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP.

Nat Rev Immunol. 1(1):50-8.

Terracino CMN, MacLeod KT (1994)

The effect of acidosis on sodium-calcium exchange and consequences for relaxation in isolated cardiac myocytes from guinea pigs.

Am J Physiol. 267: H477-H487

Uchiyama T, Engelman RM, Maulik N, Das DK (2004)

Role of Akt signalling in mitochondrial survival pathway triggered by hypoxic preconditioning.

Circulation. 109: 3041-3049

Usta E (1999)

Etablierung einer Methode zur Messung des Ionentransports an humanen intestinalen Epithelzellen - als Vesikel kultiviert.

Dissertation Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Uusimaa PA, Ruskoaho H, Leppaluoto J, Hassinen IE (1990)

Cytosolic Ca²⁺ during atrial natriuretic peptide secretion from cultured neonatal cardiomyocytes.

Mol Cell Endocrinol. 73: 153-163

van der Laarse A, Altona IC, van Dijkman PR, Zoet TC, de Vries J, Lelkens RR. (1984)

Metabolic blocker-induced cell damage in rat cardiac tissue. Comparison of three models currently used: the isolated perfused heart, heart cell cultures and isolated myocytes.

Res Commun Chem Pathol Pharmacol. 43(1): 43-54

Von Harsdorf R, Li PF, Dietz R (1999)

Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis.

Circulation. 99(22): 2934-2941

Wang L, Ma W, Markovich R, Chen JW, Wang PH (1998)
Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insuline-like growth factor I.
Circ Res. 83: 516-522

Wang X, Takeda S, Mochizuki S, Jindal R, Dhalla NS (1999)
Mechanisms of Hydrogen Peroxide-Induced increase in Intracellular Calcium in cardiomyocytes.
J Cardiovasc Pharmacol Ther. 4: 41-48

Wasser JS, Heisler N (1997)
Effects of anoxia on intracellular free Ca²⁺ in isolated cardiomyocytes from turtles.
Comp Biochem Physiol A Physiol. 116(4): 305-312

Weber CR, Ginsburg KS, Philipson KD et al. (2001)
Allosteric regulation of Na/Ca exchange current by cytosolic Ca intact cardiac myocytes.
J Gen Physiol. 117: 119-131

Wehrens XHT, Lenhart SE, Reiken SR et al. (2004)
CaMKII phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor.
Circ Res. 94: e61-e70

Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2000)
tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c.
Genes Dev. 14: 2060-2071

Wei MC, Zong WK, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2001)
Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death.
Science. 292: 727-730

Weinlich M, Baumstark C Usta E, Becker HD, Sessler MJ (2002)
Human duodenal spheroids for noninvasive intracellular pH measurement and quantification of regulation mechanisms under physiological conditions.
In Vitro Cell Dev Biol Anim. 38: 7-13

Wilkins BJ, Molentkin JD (2002)
Calcineurin and cardiac hypertrophy: Where have we been? Where are we going?
J Physiol. 541: 1-8

Witcher DR, Kovacs RJ, Schulmann H et al. (1991)

Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates channel activity.

J Biol Chem. 266: 11144-11152

Wu Y, Dzhura I, Colbran RJ et al. (2001)

Calmodulin kinase and a calmodulin-binding 'IQ' domain facilitate L-type Ca²⁺ current in rabbit ventricular myocytes by a common mechanism.

J Physiol. 535: 679-687

Xiao RP, Cheng H, Lederer WJ et al. (1994)

Dual regulation of Ca/calmodulin kinase II activity by membrane voltage and calcium influx.

Proc Natl Acad Sci USA. 91: 9659-9663

Xu B, Zhang SL, Chen RX (1998)

Effects of verapamil on down-regulation of norepinephrine-induced beta adrenoreceptors in cultured rat cardiomyocytes.

Zhongguo Xao Li Xue Bao. 19: 148-150

Xu YJ, Shao Q, Dhalla NS (1997)

Fura-2 fluorescent technique for the assessment of Ca²⁺ homeostasis in cardiomyocytes.

Mol Cell Biochem. 172: 149-157

Yuan W, Bers DM (1994)

Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin dependent protein kinase.

Am J Physiol. 267: H982-H993

Zaugg M, Xu W, Lucchinetti E, Shafiq SA, Jamali NZ, Siddiqui MA (2000)

β -adrenergic receptor subtypes differentially affect apoptosis in adult rat ventricular myocytes.

Circulation. 102 (3): 344-350

Zhang N, Hartig H, Dzhagalov I, Draper D, He YW (2005)

The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes.

Cell Res. 15 (10): 749 - 769

Zhang WH, Fu SB, Lu FH, Wu B, Gong DM, Pan ZW, LV YJ, Zhao YJ, Li QF, Wang R, Yang BF, Xu CQ (2006)

Involvement of the calcium-sensing receptor in ischemia/reperfusion-induced apoptosis in rat cardiomyocytes.

Biochem Biophys Res Commun. 347: 872-881

Zhu WZ, Zheng M, Koch WJ, Lefkowitz RJ, Kobilka BK, Xiao RP (2001)

Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes.

Proc Natl Acad Sci USA. 98: 1607-1612

Zhu WZ, Wang SQ, Chakir K, Yang D, Zhang T, Brown JH, Devic E, Kobilka BK, Cheng H, Xiao RP (2003)

Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-dependent activation of Ca²⁺/calmodulin kinase II.

J Clin Invest. 111(5): 617-625

Zhu HF, Dong JW, Zhu HL, Zhou ZN (2003)

ATP-dependent potassium channels involved in the cardiac protection by intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury.

Life Sci. 73: 1275-1287

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X (1999)

An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9.

J Biol Chem. 274(17): 11549-11556

7 ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AIF	apoptosis inducing factor
Apaf-1	apoptotic protease-activating factor-1
ARC	apoptosis repressor with a CARD
ATP A	denosintriphosphat
BCECF-AM	2'7'-bis(Carboxyethyl)-5(6)Carboxyfluorescein-Acetoxymethylester
Bcl-2	B-cell leukemia/lymphoma 2
Ca	Calciumatom
CaMKII	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
CARD	caspase recruitment domain
CCD	cooled-coupled-device-Kamera
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cyt C	Cytochrom C
DD	death domain
DED	death effector domain
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-Aminoethylether)-N-N-N`-N`-Tetraessigsäure
Endo G	Dnase endonuclease G
FADD	Fas associated death domain
FLIP	FLICE-like inhibitory protein
Fura-2 AM	5-Oxazolcarbonsäure-,2-(6-(bis(2-((acetoxy)methoxy)-2-oxoethyl)-amino)-5-(2-(2(bis-((acetyloxy)methoxy)-2-oxoethyl)amino)-5-methyl-phenoxy)ethoxy)-2-benzofuranyl) (acetoxy)methylester
H ₂ O	Wasser
HCL	Salzsäure

Abkürzungen

HDAC	histone deacetylase
HE	Hämatoxylin – Eosin Färbung
HEDAF	5-hexadecanoylamino fluorescein
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N`-2-Ethansulfonsäure
IAPs	inhibitor of apoptosis proteins
KCl	Kaliumchlorid
KH + Ca	calciumhaltiges Krebs-Henseleit
KH	Krebs-Henseleit-Lösung
M	Mol
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
Mk	Mikroperfusionskammer
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mmol	Millimol
µmol	Mikromol
N	Anzahl der durchgeführten Versuche
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCX	Natrium/Calcium-Austauscher
NFAT	nuclear factor of T-cell activation
O ₂	Sauerstoff
Omi/HtrA2	Bezeichnung für eine mitochondriale Protease, die Inhibitoren der Apoptose antagonisiert
PARP	(Anti-Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
pH	pondus Hydrogenii
PJ	Propidiumjodid
PKA	Proteinkinase A
PTP	Permeability Transition Pore
R	Ratio = calciumsensitiv _{340 nm} : calciuminsensitiv _{380 nm}

Abkürzungen

RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RyR2	Ryanodin-Rezeptoren
SEM	Standard error of the mean
SERCA	sarkoendoplasmatische Retikulum Calcium-ATPase
SMAC	SMAC/Diablo = pro-Apoptose-Protein, das Apoptose-Inhibitoren antagonisiert/neutralisiert
Tab.	Tabelle
TNF	tumor-necrosis-factor- α
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

8 DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. med. Gerhard Ziemer für die Überlassung dieses Themas und die Möglichkeit zur Promotion.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Herrmann Aebert für seine geduldige Unterstützung und wertvollen Ratschläge nicht nur bei der wissenschaftlichen Arbeit sondern auch während der Famulaturen. Hier habe ich die Freude an der Chirurgie entdeckt.

Ebenso bedanke ich mich bei Dr. med. Engin Usta für seine kompetente Hilfe und Motivation bei der Durchführung der Versuche im Labor und Auswertung der Daten.

Auch möchte ich an dieser Stelle allen, die mir im Labor immer wieder hilfsbereit zur Seite standen, ganz herzlich danken. Durch die angenehme Atmosphäre wurde die Arbeit um einiges erleichtert.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Falko Fend für die Ermöglichung der Kryoschnitt-Anfertigung im Pathologischen Institut.

Für die Unterstützung und Mithilfe bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit möchte ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. Klaus Dietz bedanken.

Bei dieser Arbeit wirkten hinsichtlich Formatierung und Korrektur Lukasz Konieczny und Nithart Grützmacher mit, vielen herzlichen Dank dafür.

Allen meinen Freunden danke ich für die schöne gemeinsame Studienzeit; hier sollen insbesondere Stefanie Kaiser und Solène Kalle erwähnt sein, deren Freundschaft weit über das Studium hinausgeht und noch immer besteht.

Bei meinen Eltern und meinen Geschwistern bedanke ich mich von ganzem Herzen, dass sie mich nicht nur in Bezug auf das Medizinstudium und diese Arbeit unterstützt haben und immer für mich da waren.

Schließlich möchte ich meinem Freund Dirk Freudenstein danken. Er hat mich vor allem in der letzten Phase der Arbeit bestärkt, seiner Unterstützung und Vertrauen konnte ich mir immer sicher sein.

9 LEBENS LAUF

**Persönliche
Angaben:**

Name:	Mirjam Renovanz
Geburtsdatum:	15. Juni 1980
Geburtsort:	Biberach an der Riß
Familienstand:	ledig

Schulbildung:

Grundschole:		
Grundschole, Heroldstatt		1987-1989
Schillerschole, Reutlingen		1989-1991
Weiterführende Schole:		
Albert-Einstein-Gymnasium, Reutlingen		1991-2000
Allgemeine Hochschulreife		06/2000

Studium:

Beginn des Studiums der Humanmedizin Eberhard-Karls-Universität, Tübingen		10/2000
Ärztliche Vorprüfung		09/2002
1. Staatsexamen		08/2003
2. Staatsexamen		03/2006
Auslandssemester:		
Universität de Franche-Comté Besançon, Frankreich		02-06/2005
Praktisches Jahr		04/2006 – 03/2007
Klinik für Neurochirurgie (Wahlfach) Universitätsklinikum Tübingen, Hôpital de la Providence Neuchâtel und Universitätsspital Zürich		

Approbation als Ärztin:

06/2007

Ausbildung zur Fachärztin für Neurochirurgie:

seit 06/2007

Klinikum Stuttgart, Abteilung für Neurochirurgie, Katharinenhospital
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Nikolai Hopf)