

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

I. Medizinische Klinik

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

**Einfluss des  $G\alpha_q$ -Proteins auf die Anoxietoleranz  
isolierter Mäusekardiomyozyten**

Torben Friedrich Wilhelm Altmann genannt Brewe

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. M. Seyfarth
2. Univ.-Prof. Dr. A. Kastrati

Die Dissertation wurde am 15.10.2010 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin  
am 17.11.2010 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Schrifttum</b> .....	<b>3</b>
2.1 Myokardinfarkt.....	3
2.1.1 Ätiologie .....	3
2.1.2 Pathogenese.....	3
2.2 Ischämie und Reperfusion .....	7
2.2.1 Ischämie.....	7
2.2.2 Reperfusion.....	11
2.3 Thrombozyten .....	15
2.3.1 Entstehung und Struktur.....	15
2.3.2 Funktion .....	17
2.3.3 Rolle der Thrombozyten im akuten Koronarsyndrom.....	22
2.3.4 Mäuse und Menschen 1 .....	23
2.4 G-Proteine .....	24
2.4.1 Struktur.....	24
2.4.2 Funktion .....	26
2.4.3 G-Proteine in Thrombozyten .....	30
2.4.4 G-Proteine im Herzen.....	31
<b>3. Material</b> .....	<b>35</b>
3.1 Chemikalien, Medien, Puffer, Lösungen .....	35
3.2 Geräte und Laborbedarf:.....	37
3.3 Versuchstiere: .....	37
3.4 Mäuse und Menschen 2.....	40
<b>4. Methoden</b> .....	<b>41</b>
4.1 Ischämie adulter Kardiomyozyten .....	41
4.1.1 Herzentnahme .....	41
4.1.2 Isolation der Zellen .....	42
4.1.3 Zellkultur.....	44
4.1.4 Anoxie der isolierten adulten Kardiomyozyten .....	45
<b>5. Ergebnisse</b> .....	<b>46</b>

<b>6. Diskussion .....</b>	<b>48</b>
6.1 Zielsetzung .....	48
6.2 Versuchsdurchführung.....	49
6.3 Ergebnisse.....	51
<b>7. Zusammenfassung .....</b>	<b>55</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>56</b>
<b>9. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>58</b>
<b>10. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>59</b>
<b>11. Danksagung .....</b>	<b>74</b>

### 1. Einleitung

Der akute Myokardinfarkt ist eine der häufigsten Erkrankungen der Industrienationen. In der Bundesrepublik Deutschland verstarben 2006 über 65000 Menschen an dieser Krankheit, damit ist der Herzinfarkt die zweit häufigste Todesursache. (Peterson S et al. 2005)

Die vorliegende Arbeit untersucht die Rolle des Signalmoleküls  $G\alpha_q$  bei der Infarktentstehung anhand eines  $G\alpha_q$ -defizienten Tiermodells.  $G\alpha_q$  hat einen erheblichen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion und spielt deshalb bei einem akuten Myokardinfarkt eine zentrale Rolle. Bereits vor der Entstehung eines Infarktes beeinflussen Thrombozyten durch die Sekretion bestimmter Botenstoffe die Entwicklung einer atherosklerotischen Läsion (Fuster V et al. 1992). Kommt es zum Einriss einer solchen atherosklerotischen Plaque, werden die im Blutstrom fließenden Thrombozyten aktiviert. Danach sind diese in der Lage zu Konglomeraten zu aggregieren, die das Herzkranzgefäß verschließen können (Falk E et al. 1995; George JN 2000). Das im Versorgungsbereich des Gefäßes liegende Gewebe ist dann vom Blutstrom abgeschlossen, wird zunächst ischämisch und stirbt im Verlauf der Zeit ab. Durch die Sekretion von Entzündungsmediatoren, Chemokinen und Zytokinen beeinflussen Thrombozyten auch noch nach dem Gefäßverschluss die Größe des Myokardinfarktes. Die Steuerung der Thrombozytenfunktion unterliegt zu einem erheblichen Maß G-Proteinen und insbesondere dem  $G\alpha_q$ -Protein (Offermanns S 2006). Diese Gruppe an Molekülen ist für die Signalweiterleitung innerhalb einer Zelle verantwortlich (Neves SR et al. 2002). Das  $G\alpha_q$ -Protein befindet sich zusammen mit seinem Strukturanalogon dem  $G\alpha_{11}$ -Protein auf nahezu allen Säugetierzellen. Nur Thrombozyten bilden hier eine Ausnahme, da sie auf Ihrer Oberfläche kein  $G\alpha_{11}$  sondern ausschließlich  $G\alpha_q$  ausbilden (Offermanns S et al. 1998).

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe beobachteten wir, dass Mäuse, die kein  $G\alpha_q$  besitzen ( $G\alpha_q$ -Knock-out-Mäuse), nach Ligatur eines Herzkranzgefäßes signifikant kleinere Infarkte ausbildeten als Wildtypmäuse (Weig HJ et al. 2008). Da das  $G\alpha_q$ -Protein sowohl in Thrombozyten als auch in Herzmuskelzellen fehlt, waren weitere Kontrolluntersuchungen nötig, um die Grundlage dieses Effektes zu klären. Im nächsten Schritt transplantierten wir  $G\alpha_q$ -Knock-out-Knochenmark in Wildtypmäuse. Mit diesen chimären Mäusen wurden wieder Ligaturversuche gemacht und dabei

## 1. Einleitung

zeigte sich, dass Wildtypmäuse mit transplantiertem  $G\alpha_q$ -Knock-out-Knochenmark zwar kleinere Infarkte erlitten als die Wildtypmäuse, der Effekt im Vergleich zur  $G\alpha_q$ -Knock-out-Maus aber deutlich geringer blieb (Weig HJ et al. 2008).

Die vorliegende Arbeit knüpft hier an und untersucht, ob  $G\alpha_q$  exprimierende Kardiomyozyten eine bessere Anoxietoleranz aufweisen. Dazu werden zunächst einzelne Mäusekardiomyozyten isoliert und in Zellkultur gebracht. Ziel ist es, alle störenden Einflüsse durch andere Zellen oder Blutbestandteile auszuschließen. Anschließend werden die isolierten Kardiomyozyten unter kontrollierten Bedingungen einem anoxischen Reiz ausgesetzt um einen möglicherweise bestehenden Unterschied in der Anoxietoleranz zwischen  $G\alpha_q$ -Knock-out- und Wildtypkardiomyozyten zu messen.

## 2. Schrifttum

### 2.1 Myokardinfarkt

#### 2.1.1 Ätiologie

Das akute Koronarsyndrom mit seinen Unterformen, dem akuten Myokardinfarkt, der instabilen Angina Pectoris und dem plötzlichen Herztod, entsteht in der Mehrzahl der Fälle auf der Grundlage einer Atherosklerose (Fuster V 1994). Ab einem Stenosegrad von 70-80% wird das stenosierte Gefäß symptomatisch, da das Herz bei erhöhtem Sauerstoffbedarf nicht mehr ausreichend durchblutet wird. Die Größe der atherosklerotischen Läsion, der sogenannten Plaque, gibt aber keinen Hinweis auf die Anfälligkeit des Gefäßes für einen akuten Verschluss, da sich viele Koronarthrombosen nur auf dem Boden einer leichten Atherosklerose entwickeln (Tschoepe D et al. 2006). Verliert eine atherosklerotische Läsion einmal ihre Stabilität und reißt ein, entwickelt sich auf ihrer Oberfläche ein Abscheidungsthrombus und das Gefäß wird verschlossen. Kommt es bei einem subtotalen oder kompletten Verschluss nicht innerhalb eines bestimmten Zeitraumes zu einer Eröffnung, entwickelt sich im abhängigen Stromgebiet der Arterie eine Kolliquationsnekrose. Neben dem Verschluss eines Koronargefäßes durch einen Thrombus gibt es auch noch andere, seltenere Ursachen für einen Myokardinfarkt. Hierzu zählen zum Beispiel akute Gefäßdissektionen, primäre und sekundäre Vaskulitiden, Gefäßspasmen, rheologische Blutbildveränderungen, Embolien bei Vorhofflimmern oder auch im Rahmen einer gekreuzten Embolie bei bestehendem Vorhofseptumdefekt. Da 60 bis 70% der Infarkte durch Plaquerupturen entstehen, beschränkt sich diese Arbeit auf akute Koronarsyndrome mit atherosklerotischer Genese (Falk E et al. 1995).

#### 2.1.2 Pathogenese

Die Mehrzahl der akuten Myokardinfarkte entwickelt sich auf dem Boden einer Atherosklerose und dem Gefäßverschluss durch einen Thrombus (Falk E 1983; Falk E 1985; Falk E et al. 1995; Davies MJ et al. 1984; Mc Isaak AI et al. 1993).

Die Grundlage des Verschlusses bildet die atherosklerotische Plaque. Ihre Entstehung ist mit einer Reihe von Risikofaktoren assoziiert. Dazu zählen

## 2. Schrifttum

insbesondere Rauchen, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, erhöhtes Alter und männliches Geschlecht (Fuster V 1994). Bereits im Kindesalter kann man sogenannte „fatty streaks“ finden, die eine Frühform der Arteriosklerose darstellen. Sie bestehen aus einer Ansammlung von Fett speichernden Makrophagen. Diese mit Cholesterinester beladenen Zellen bezeichnet man als Xanthomzellen oder Schaumzellen.

Die Entstehung einer Gefäßplaque ist ein mehrstufiger Prozess. Er beginnt mit einer Schädigung des Endothels durch z.B. Entzündungsreaktionen oder mechanische Reizung und einer daraus resultierenden Dysfunktion des Gefäßendothels (Davignon J et al. 2004). In Folge der Schädigung kommt es zur erhöhten Durchlässigkeit des Endothels für LDL (low density lipoprotein) und andere Plasmabestandteile. Der Einbau des LDL in die Gefäßintima kann auf mehreren Wegen erfolgen. Zum Beispiel über ein passives Eindringen in durchlässig gewordene Gefäßwände oder durch eine Rezeptor abhängige Aufnahme (Fuster V. et al. 1992; Watanabe et al. 1994). Neuere Untersuchungen betonen die Wirkung von aktivierten Thrombozyten. Diese setzen reaktive-Sauerstoff-Spezies frei (ROS), die zur Oxidation von LDL zu mo-LDL (minimal-oxidiertes LDL) führen und stimulieren wiederum die Aufnahme von oxidiertem LDL durch Makrophagen. Sie sorgen sogar zu einer Differenzierung von CD 34 positiven Vorläuferzellen in Zellen der Monozyten/Makrophagen Gruppe und beschleunigen den Prozess der Atheroskleroseentstehung massiv (Daub K et al. (2007). Das anfallende Mo-LDL vermindert direkt die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) im Endothel. Damit entfällt ein wichtiger Mediator für die Gefäßdilatation (Quyyumi AA et al. 1995). Darüber hinaus initiiert NO Adhäsionsmoleküle für Monozyten, Makrophagen und Leukozyten (Vink H et al. 2000). Die eingewanderten Monozyten differenzieren sich unter dem Einfluss von Zytokinen zu Makrophagen weiter. Diese Makrophagen phagozytieren wie bereits oben angedeutet unter dem Einfluss von aktivierten Thrombozyten das abgelagerte LDL und sind anschließend unter dem Mikroskop als Schaumzellen sichtbar. Das oxidierte LDL wird in großen Mengen über den Scavenger-Rezeptor phagozytiert, der keiner Sättigungskinetik unterliegt. Sterben die entstandenen Schaumzellen ab, werden zahlreiche Zytokine freigesetzt, die eine Entzündungsreaktion initiieren. Freigesetzte Proteasen kommen in Kontakt mit dem Gewebe und degenerieren die umgebende Matrix. Makroskopisch sind die abgestorbenen Makrophagen Ansammlungen als oil-lipid-rich Plaque zu erkennen. Die überlebenden

## 2. Schrifttum

Schaumzellen bilden zusätzlich Interleukine, Komplementfaktoren und andere Mediatoren, die zu einer Emigration von weiteren Monozyten führen. Diese Ansammlung von Entzündungszellen und die Freigabe von Enzymen führen zu einer zunehmenden Schädigung des Endothels und dadurch zu einer verminderten NO-Produktion, zur Zytolyse und Desintegration der extrazellären Matrix. Im Zuge der Endotheldysfunktion und der Entzündungsreaktion fallen große Mengen an ROS (reactive-oxygen-species) an, die wiederum die abnehmende Menge an dilatierendem NO inaktivieren (Cai H, Harrison DG 2000). Am geschädigten Endothel lagern sich Thrombozyten an, die Zytokine wie PDGF (platelet derived growth factor) und TGF- $\beta$  (transforming-growth-factor- $\beta$ ) freisetzen und auch als weitere Quelle für Lipide dienen (Fuster V et al. 1992; Chandler AB et al. 1961). Am Ende des Prozesses lockert sich der enge Kontakt der Endothelzellen auf und Plasmabestandteile können in die Intima eindringen. Es entwickelt sich ein Ödem. Die im Rahmen der Entzündungsreaktion freigesetzten Chemokine führt zu einer zusätzlichen Leukozytenimmigration, die die entstehende Entzündungsreaktion noch weiter verstärkt. Gleichzeitig akkumulieren Mediatoren, die zu einer vermehrten Einwanderung und Proliferation von glatten Muskelzellen (SMC) führen (Hoak JC 1988). Diese Muskelzellen proliferieren und bilden vermehrt Kollagen und Elastin. Dadurch entwickelt sich eine ausgeprägte Fibrose, die Elastizität des Gefäßes lässt nach und die atherosklerotische Gefäßplaque gewinnt zunehmend an Größe. Neben der hervorstechenden Bedeutung der Entzündung als Ursache für die Entstehung der Atherosklerose, gibt es auch noch andere mögliche Ursachen, die diesen Prozess unterstützen können. Eine These geht davon aus, dass bestimmte Mikroorganismen über eine Entzündungsreaktion zu einer Atherosklerose führen oder zumindest deren Entstehung fördern. So ist zum Beispiel ein erhöhter CRP- (C reaktives Protein) Spiegel im Blut mit einer Endotheldysfunktion assoziiert (Fichtlscherer S et al. 2000). Das zu den akute-Phase-Proteinen gehörende Protein, ist ein empfindlicher aber unspezifischer Marker für Entzündungen mit bakterieller Genese. Ein weiterer Hinweis auf einen Einfluss von Infektionen ist das vermehrte Vorkommen von Mikroorganismen wie Chlamydien innerhalb einer Plaue (Libby et al. 1997). Am Ende dieser verschiedenen Einflüsse ist eine reife Plaue mit einem lipidhaltigen Kern entstanden. Diese Gebilde nennt man Atherom. Im Laufe der Zeit wird das Atherom fibrös organisiert und es kommt zu einem vermehrten Einbau von Kalzium (Demer LL et al. 1994). Nach außen trennt nur eine dünne Schicht aus Endothel die Plaue vom



## 2. Schrifttum

Blutstrom. Mit zunehmender Größe kommt es zu einer Stenosierung des Gefäßes. Allerdings wird solch eine Stenose erst im ausgeprägten Zustand mit einer Verringerung des Gefäßquerschnittes um ca. 70% für den Blutfluss limitierend.

Reißt ein Atherom ein, kann durch einen plötzlichen Verschluss des Gefäßes ein akuter Myokardinfarkt entstehen (Falk E et al. 1995). Am häufigsten findet man dabei eine Ruptur der fibrösen Kappe. Weitere Formen sind die oberflächige Atheromerosion, die Erosion eines kalzifizierten Knoten oder die Plaqueeinblutung (Virmani R et al. 2002). Die Vulnerabilität eines Plaques hängt von mehreren Faktoren ab: Erstens dem Verhältnis von Kollagen zu Lipid, zweitens der Stabilität der fibrösen Kappe, drittens der Stärke der Entzündungsreaktion und viertens der Materialermüdung, die von der Wandspannung, der Plaquekompression und den auftretenden Scher- und Biegekräften abhängt (Falk E et al. 1995; Hansson GK 2005). Besonders an der Schulter der Plaques, dem Übergang zwischen Gefäßwand und Atherom, sind diese Scherkräfte besonders hoch. So findet man auch an dieser Stelle die häufigsten Rupturen, zumal die Anzahl an Entzündungszellen in diesem Areal auch besonders hoch ist (Falk E et al. 1995). Unter diesem Gesichtspunkt liegt die Vermutung nahe, dass besonders große Plaques zu Rupturen neigen. Das Gegenteil ist aber der Fall. Mehrere angiographische Studien zeigten, dass die Mehrheit der Koronararterienverschlüsse bei nur gering ausgeprägter Atherosklerose zu finden war. Der Grund dafür ist allerdings unbekannt (Tschoep D. et al 2006).

Zum kompletten Verschluss des Gefäßlumens kommt es dadurch, dass nach der Plaqueruptur aus dem Inneren des Atheroms viele prokoagulatorische Stoffe dem Blutstrom ausgesetzt werden und die prokoagulatorische Oberfläche der gerissenen Plaques zu einer massiven Aktivierung der Gerinnungskaskade führt. Stoffe wie subendotheliales Kollagen, freigesetzter Tissue-faktor, Phospholipide und Thromboxan A<sub>2</sub> führen zu einer massiven Aktivierung von Thrombozyten, Freisetzung zusätzlicher vasoaktiver Substanzen und einer Aktivierung der plasmatischen Gerinnung. Dabei spielen die Thrombozyten besonders im arteriellen Stromgebiet der Koronarien eine wichtige Rolle. Sie sind es, die bei hohen Scherkräften die wichtigsten Vermittler der Blutgerinnung sind. Deshalb lassen sich auch im Kern eines Koronarthrombus besonders viele aggregierte Thrombozyten nachweisen (Ueda Y et al. 1996).

## 2. Schrifttum

Der Prozess, der zu einem Koronarthrombus führt, lässt sich also mit vier Schritten zusammenfassen: 1. Entwicklung einer atherosklerotischen Läsion 2. Verletzung oder Dysfunktion des Endothels 3. Vasospasmus 4. Gerinnungsaktivierung.

## 2.2 Ischämie und Reperfusion

### 2.2.1 Ischämie

Der Verschluss eines Koronargefäßes durch einen Thrombus führt im nachgeschalteten Versorgungsbereich zu einer Ischämie. Der griechische Begriff Ischämie bedeutet Blutleere. Man spricht von einer Ischämie, wenn in einem Gewebe der arterielle Blutfluss so gering ist, dass die physiologische Gewebefunktion nicht erhalten werden kann (Jennings RB 1970). Im Unterschied zur Anoxie, bei der lediglich die Versorgung mit Sauerstoff und damit die oxidative Phosphorylierung beeinträchtigt ist, herrscht sowohl ein Mangel an neuen Substraten (z.B. Sauerstoff, Glucose, etc.) als auch ein Stau an anfallenden Stoffwechselmetaboliten, da diese nicht abtransportiert werden.

Das menschliche Herz ist von einer Ischämie aus zwei Gründen besonders stark betroffen: Erstens stellt es seine Energieträger nahezu rein oxidativ, also in Anwesenheit von Sauerstoff, her. Zweitens gibt es im Myokard, im Gegensatz zu vielen anderen Organen, keine Kollateralgefäße, die im Falle eines Gefäßverschlusses für die weitere Blutzufuhr sorgen könnten. Konkret bedeutet das für den Herzmuskel folgendes: Nach einer Unterbrechung des Blutflusses kann die aerobe Glykolyse, also die Energiefreisetzung aus Zucker mit der Anwesenheit von Sauerstoff, noch für weitere 15 bis 20 Sekunden energiereiche Nukleotide produzieren. Danach ist der Sauerstoffgehalt soweit gesunken, dass die Energiegewinnung nur noch durch die deutlich ineffektivere anaerobe Glykolyse gewährleistet wird. Diese produziert lediglich ein Viertel an energiereichen Substraten und erhöht deutlich den intrazellulären Laktatgehalt (Jennings RB et al. 1991). Aber auch die anaerobe Glykolyse kann nach weiteren 60 Sekunden nur noch mit geringer Effektivität ATP (Adenosintriphosphat) erzeugen. Durch das unausgeglichene Verhältnis von  $\text{NADH}_2$  zu NAD, dem steigenden Gehalt an anorganischem Phosphat und dem fallenden pH-Wert wird die Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase gehemmt. Durch den Ausfall dieses

## 2. Schrifttum

Enzymes erlischt auch die anaerobe Glykolyse nach weiteren 60 Minuten (Jennings RB et al. 1991).

Alles in allem führt der versiegende Blutfluss im Myokard zu einem zellulären Ungleichgewicht. Durch das Sistieren der aeroben Glykolyse und dem Einsetzen der anaeroben Glykolyse, dem Verlust an energiereichen Phosphaten und deren Desintegration, der Akkumulation von Stoffwechselprodukten wie Laktat und  $\alpha$ -Glycerolphosphat erlischt das Energiedepot der Zelle mit Auswirkungen auf alle Bereiche der Zellphysiologie. Anhand bestimmter Parameter lässt sich diese Entwicklung gut skizzieren: (siehe auch Abb.1)

pH-Wert: Als Endprodukt der anaeroben Glykolyse fällt in großen Mengen Laktat an. Durch die hohe Konzentration dieser Säure sinkt der pH-Wert deutlich ab (Owens LM et al 1996). Das entstehende saure Milieu verschlechtert die Funktion vieler Enzyme und aktiviert lytische Enzyme. Da deren Funktionsoptimum im sauren pH-Bereich liegt, beginnen sie unmittelbar mit der Zerstörung des Zellinhaltes. Als Gegenregulation auf den fallenden pH Wert befördert der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher anfallende Protonen ( $\text{H}^+$ ) aus der Zelle heraus und erhöht gleichzeitig den intrazellulären Natriumgehalt mit Auswirkungen auf die Zellhomöostase.

$\text{Na}^+$ : Durch das geringere Angebot an energiereichen Phosphaten wie Adenosintriphosphat (ATP) sinkt die Leistung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Donoso P et al. 1992). Also steigt intrazellulär der  $\text{Na}^+$ -Gehalt an und die Kaliumkonzentration sinkt. Auch der oben beschriebene  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher erhöht die  $\text{Na}^+$ -Konzentration. Erhöhte intrazelluläre Natriumkonzentrationen führt durch den entstehenden osmotischen Druck zu einem vermehrten Wasser Einstrom in die Zelle mit resultierendem Zellödem. Der Natriumgradienten ist aber auch für das elektrische Membranpotential der Zelle mitverantwortlich. Aufgrund des geringeren transmembranären  $\text{Na}^+$ -Gradient kommt es zur Depolarisation der Zelle mit Auswirkungen auf die elektrisch verbundenen Nachbarzellen und somit auf den gesamten Zellverbund (Cordeiro JM et al. 1994).

$\text{Ca}^{2+}$ : Kalzium ist das im Körper am feinsten regulierte Ion, da seine Konzentration regulatorische Funktion besitzt. Der wichtigste Auslöser, der intrazellulär zu einer erhöhten Kalziumkonzentration führt, ist eine ansteigende intrazelluläre Natriumkonzentration. Diese bewirkt eine vermehrte Aktivität des  $3 \text{Na}^+/\text{Ca}^+$ -Austauscher, der Natrium aus der Zelle ins Zellinnere pumpt. Um die erhöhte Natriumkonzentration zu senken pumpt der  $3 \text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher Natrium aus der

## 2. Schrifttum

Zelle und Kalzium ins Zellinnere. Ein Anstieg der Kalziumkonzentration aktiviert wiederum lytische Enzyme wie Proteasen, Phospholipasen und Nukleasen (Donoso P et al. 1992). Es verändert den Phosphorylierungszustand von Funktions- und Strukturproteinen und aktiviert den kontraktilem Apparat, so dass es am Ende der Entwicklung zu einer mechanischen Zellschädigung kommt (Farber JL et al. 1981; Piper HM 1989).

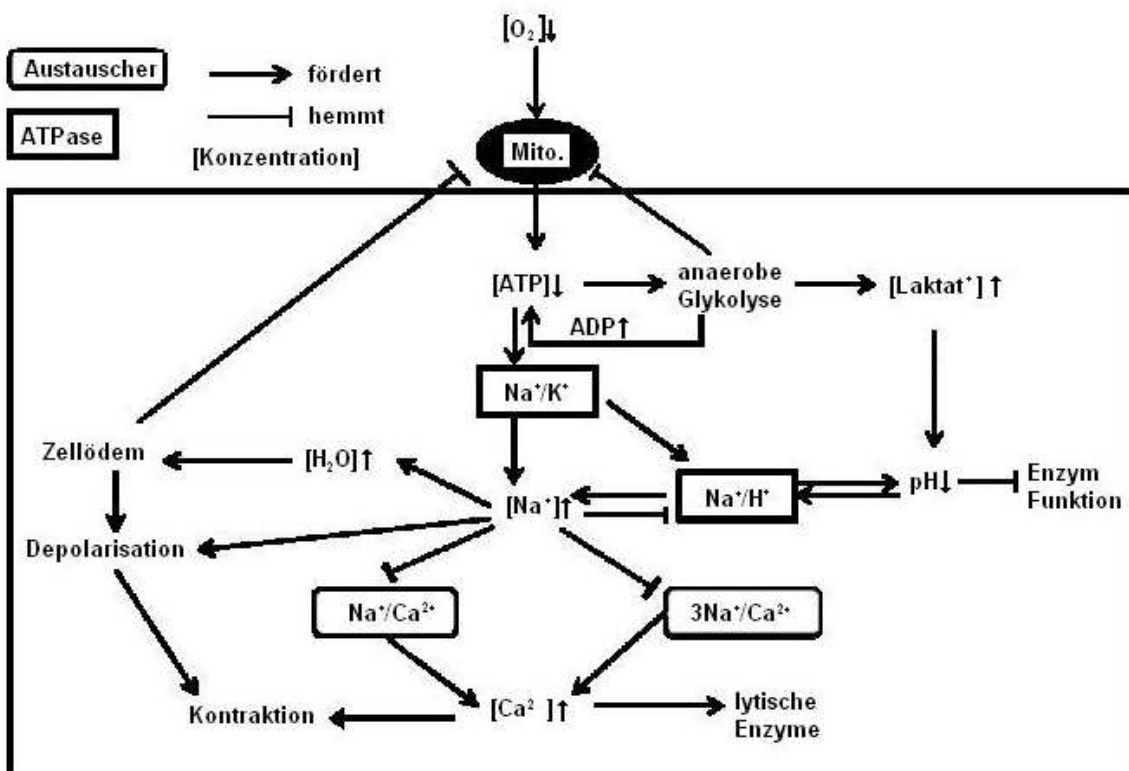
Osmotische Konzentration: Durch den stehenden Blutstrom werden Stoffwechselmetabolite nicht mehr entfernt und können akkumulieren. Parallel dazu werden Energieträgern mit nur geringer osmotischer Wirkung (Glucose und Glykogen) zu vielen einzelnen osmotisch wirksamen Teilchen verstoffwechselt und erhöhen den osmotischen Gradienten zum Extrazellulärraum drastisch. Bereits nach einer Ischämie von einer Minute ist die Laktatkonzentration auf das Vierfache angestiegen. In Kombination mit der steigenden Natriumkonzentration strömt kompensatorisch viel freies Wasser in die Zelle ein und es entwickelt sich ein Zellödem (Jennings RB et al. 1986).

Als Folge dieser oben beschriebenen Entwicklungen wird die Zell- und Mitochondrienmembran der Kardiomyozyten geschädigt. Es kommt zu einer Zerstörung von Enzymen und Nukleotiden. Lysosomale Enzyme werden aus den Lysosomen freigesetzt und durch den niedrigen pH-Wert und die erhöhte Kalziumkonzentration aktiviert. Aufgrund der anfallenden Stoffwechselendprodukte und des Ionenungleichgewicht strömt Wasser ein und führt zu einem Ödem. Parallel dazu bewirkt die Ionenfehlregulation eine Kontraktur der Zelle mit zusätzlicher mechanischer Zerstörung.

Die direkte Schädigung des myokardialen Gewebes ist aber nicht der einzige Faktor, der zum Zelltod führen kann. Untersuchungen, die sich mit der Todesursache von Zellen innerhalb der ersten sechzehn Stunden nach einem Herzinfarkt befassten, stellten eine deutlich erhöhte Apoptoseaktivität fest. Sowohl beim Menschen als auch beim Nagetier scheint der programmierte Herztod für mindestens 5-30% der Zellenuntergänge verantwortlich zu sein (Crow MT et al. 2004; Kang PM et al. 2000; Bialik S et al. 1997; Palokoki E et al. 2001). Ob dieser Effekt durch die Ischämie oder durch die anschließende Reoxygenierung zu erklären ist, ist allerdings noch nicht geklärt. Eine Apoptoserate von 5-30% scheint zunächst nicht bedeutsam zu sein. Zur besseren Einordnung dieser Zahlen helfen die Untersuchungsergebnisse eines Mausmodells mit einer Apoptoserate von lediglich 0,023%. Innerhalb von acht bis

## 2. Schrifttum

vierundzwanzig Wochen entwickelten diese Mäuse eine ausgeprägte Herzmuskelschwäche mit Dilatation des linken Ventrikels (Wencker W et al. 2003). Als Auslöser für die Apoptose nach einem ischämischen Ereignis werden derzeit zwei Wege diskutiert. (Jennings RB et al. 1986) Erstens kann eine direkte intrazelluläre Schädigung durch den oxidativen Stress, DNA-Desintegration oder falsche Proteinfaltung das Apoptoseprogramm der Zelle auslösen. Zweitens kann es durch bestimmte Liganden (Fas, TNF- $\alpha$ , etc.) zu einer Aktivierung des Death-Rezeptors und dadurch zur Caspasenfreisetzung kommen. Am Ende dieses Prozesses steht in beiden Fällen eine gemeinsame Endstrecke, bei der es zu einer Ausschüttung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und letztendlich zum Absterben der Zelle kommt. Die Relevanz dieser Beobachtung zeigt sich dadurch, dass man durch medikamentöse Inhibition der Caspasen die Anzahl der sterbenden Zellen während einer Ischämie reduzieren kann (Holly TA et al. 1999; Huang JQ et al. 2000).



**Abb. 1:** Schematische Übersicht der Elektrolytverschiebungen einer Zelle als Folge eines reduzierten Sauerstoffangebots mit Betonung der zentralen Rolle des Natriumions

### 2.2.2 Reperfusion

Um die Größe eines Myokardinfarktes zu begrenzen oder wenigstens dessen weitere Ausdehnung zu verhindern, besteht die einzige Therapie in der Reperfusion des betroffenen Gewebes durch die Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes. Die Todesrate von Patienten mit erfolgreicher Reperfusion liegt trotz optimaler Therapie bei ca. 10%. Die Vermutung, dass möglicherweise eine Schädigung des Myokardes durch die Reperfusion verursacht werden könnte, wird bereits seit vielen Jahren diskutiert. Jennings postulierte bereits in den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts, dass die therapeutische Reperfusion auch zu einer Schädigung des Myokards führen kann (Jennings RB et al. 1960). Tierexperimentelle Studien haben in diesem Zusammenhang ergeben, dass die Reperfusion sogar für bis zu 50% der Infarktgröße verantwortlich sein kann (Yellon DM et al. 2007). Als Reperfusionsschaden bezeichnet man die Schädigung des Herzens durch die Wiederherstellung des koronaren Blutflusses nach einer ischämischen Episode (Piper HM et al. 1998). Allerdings ist die Infarkttherapie hinsichtlich der Reperfusion alternativlos. Bleibt die Reperfusion aus, entsteht im Ischämiebereich eine Nekrosezone. Ziel zukünftiger Therapiemaßnahme muß es also sein, den Reperfusionsschaden zu verhindern.

Zurzeit geht man davon aus, dass für die Entstehung des Reperfusionsschadens vier mögliche Mechanismen verantwortlich sind (Yellon DM et al. 2007; Piper HM et al. 1998):

1. **Myokardial Stunning:** So bezeichnet man die mechanische Dysfunktion des Gewebes nach der Reperfusion, obwohl kein irreversibler Schaden der Zellen zu finden ist und der koronare Fluss wiederhergestellt wurde (Bolli R et al. 1999). Für diese Annahme gibt es mehrere mögliche Erklärungsmodelle. Erstens beeinträchtigt der oxidative Stress direkt die Funktion des kontraktilen Apparates und verhindert durch Schädigung der Strukturproteine die Wiederaufnahme der Kontraktion. Zweitens kommt es zu einer Sarkolemmadysfunktion, bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ins Zellinnere freigesetzt werden. Drittens verursacht die in Kapitel 2.2.1 beschriebene  $\text{Na}^+$ -Überladung der Zelle einen Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels. Die erhöhte Kalziumkonzentration aktiviert wiederum proteolytische Enzyme, die den kontraktilen Apparat andauern und seine Funktion schädigen.

## 2. Schrifttum

2. **No Reflow Phänomen:** Trotz erfolgreicher Rekanalisierung des Gefäßlumens lässt sich im wiedereröffneten Gefäß kein Blutfluss nachweisen. Dieses Phänomen wurde zum ersten Mal von Kloner beschrieben (Kloner RA et al. 1974). Durch eine Verschleppung von Plaquebestandteilen im Rahmen der Reperfusion kommt es zu einem Verschluss der kleinen Gefäße im weiteren Stromgebiet. Werden Teile der abführenden Gefäße eines Hauptstammes verlegt, reduziert sich die Mikrozirkulation deutlich. Ein Abgang von größeren Thrombuspartikeln während einer perkutanen koronaren Intervention (PCI) ließ sich durch Dopplersonographie nachweisen (Okamura A et al. 2005). Die Auswaschung von Debris in die Peripherie wurde in der Studie von Stone bei bis zu 73% der untersuchten PCI beobachtet (Stone GW et al. 2005). Allerdings zeigte sich in der Emerald-Studie, dass die Aspiration von freigesetztem Debris distal der PCI im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Verbesserung brachte (Stone GW, et al. 2004, Stone GW, et al. 2005). Des Weiteren sorgen Entzündungszellen und Thrombozyten, die durch die nach der Plaqueruptur freigesetzten Zytokine angezogen wurden, für eine Verstopfung von Kapillaren. Zusätzlich verengt das durch die Ischämie entstandene Gewebs- und Endothelödem das Lumen von kleinen Gefäßen ein und verhindert einen normalen Fluss in den Kapillaren (Ito H 2006; Okamura A et al. 2005).
3. **Reperfusionarrhythmien:** Dabei handelt es sich um auftretende Rhythmusstörungen nach erfolgreicher Reperfusion. Sie entstehen durch ein gestörtes zelluläres Gleichgewicht an Ionen und durch die während der Ischämie entstandenen Metabolite. Mit der Wiedereröffnung des Gefäßes wird das während des Verschlusses veränderte extrazelluläre Milieu (siehe Kapitel 2.2.1) ausgewaschen, in andere Teile des Myokardes gespült und verursacht dort eine Elektrolytdysbalance. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Heterogenität des ischämischen Muskels. In ihm ist ein Mosaik aus bereits erholenden und sterbenden Zellen, gesundem Herzmuskel und Nekrose entstanden und stört den korrekten Ablauf der Herzmuskelkontraktion und des Reizleitungssystem (Manning AS et al. 1984).
4. **Lethal Reperfusion Injury** (Yellon DM et al. 2007): Diese Theorie geht davon aus, dass durch die Reperfusion ein tödlicher Reiz für die Myozyten gesetzt

## 2. Schrifttum

wird, die die Ischämie ohne bleibende Schäden überlebt hätten. Somit resultiert die Therapie eines Myokardinfarktes in einer Zunahme der Nekrose. Ob dieses Phänomen aber wirklich existiert, wird immer noch kontrovers diskutiert. Die Schwierigkeit im Nachweis liegt darin, dass man nicht abgrenzen kann, ob die Zellen, die nach der Reperfusion zugrunde gehen, nicht bereits vorher irreversibel geschädigt wurden (Kloner RA 1993). Ein Argument dafür ist die Beobachtung, dass man bei einer Modifikation der Reperfusionsumstände den entstehenden Schaden limitieren kann (Piper HM et al. 1998). Für die Wirkung des lethal-reperfusion-injury gibt es fünf mögliche Erklärungsmodelle:

- a) Oxygen-Paradox: Eine plötzliche Reenergenisierung führt schlagartig zu neu verfügbaren energiereichen Nukleotiden. In Kombination mit dem durch die Ischämie akkumuliertem Kalzium kommt es zu einer abrupten und übersteuerten Aktivierung des kontraktiven Apparates. Deren Folge ist die Hyperkontraktur (Piper HM et al. 1998). Der oxidative Stress kann auch direkt zur Schädigung der Myozyten führen. Die dafür verantwortlichen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) spielen auch bei dem Myocardial Stunning eine wichtige Rolle. In diesem Zusammenhang allerdings ohne die Zellen letal zu schädigen (Piper HM et al. 1983).
- b)  $\text{Ca}^{2+}$ -Paradox: Der schnelle Anstieg von Kalzium in der Zelle und in den Mitochondrien führt zu einer Hyperkontraktur. Dadurch wird das Zellinnere so geschädigt, dass die Zelle abstirbt oder ihr Apoptoseprogramm auslöst (Piper HM et al. 1998).
- c) PH-Paradox: Durch den Blutfluss wird das extrazelluläre Laktat abrupt ausgewaschen (Lemasters JJ et al. 1996). Infolgedessen kommt es zu einer Imbalance vom extra- zum intrazellulären pH-Wert. Somit werden der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  und der  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  Austauscher aktiviert. Das nun akkumulierende  $\text{Na}^+$  führt wiederum über den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher zu einem Anstieg an intrazellulärem Kalzium mit Hyperkontraktur als Folge des Kalzium-Overloads (Piper HM et al. 1998).
- d) Osmotische Imbalance: Im Laufe der Ischämie haben sich intra und extrazellulär viele Stoffwechselprodukte (siehe Kapitel 2.2.2) angehäuft.



## 2. Schrifttum

Der plötzlich wiederhergestellte Blutfluss wäscht im Extrazellulärraum die angehäuften Stoffwechselmetabolite aus und der dadurch entstehende osmotische Gradient zwischen intra- und extrazellulär führt zu Wassereinstrom in die Zelle und somit zum Zellödem (Piper HM et al. 1998).

- e) Inflammation: Die Anreicherungen von neutrophilen Granulozyten durch chemotaktische Signale aus dem rupturierten Plaque oder den Thrombozyten des Thrombus führt zum Verschluss von Gefäßen und zur Freisetzung von degradierenden Enzymen und ROS (Vinten-Johansen J 2004).

Endpunkt der oben beschriebenen Entwicklungen ist immer eine Zerstörung des Sarkolemma durch eine einsetzende Hyperkontraktur (Piper HM et al. 1998).

Vergleicht man die Fläche der initial durch die Reperfusion geschädigten Zellen mit der am Ende entstehenden Nekrose, zeigt sich bei reperfundiertem Myokard eine größere Schädigung (Piper HM et al. 1998). Bei histologischen Untersuchungen der Bereiche, in denen Zellen in Hyperkontraktur zu finden sind, lässt sich eine geometrische Anordnung der geschädigten Zellen nachweisen, die nicht durch den wiederhergestellten Fluss und die Ansammlung von toxischen Stoffen erklärbar ist (Solares J et al. 1995). Dafür gibt es zwei Erklärungsmodelle: Beim ersten Modell geht man davon aus, dass es zu einer direkten mechanischen Verletzung der über tight-junctions verbundenen Zellen im Laufe der Hyperkontraktur kommt (Ganote JN 2000). Die zweite Theorie stützt sich auf Beobachtungen bei denen isolierte Kardiomyozyten über  $Ca^{2+}$ -Mikroinjection zur Hyperkontraktur gebracht werden. Als Folge dessen entwickeln die auch nicht in direktem Kontakt stehende Zellen eine Kontraktur. Eine mögliche Ursache dafür könnte eine parakrine Übertragung des Signals durch freigesetztes Kalzium und andere Second Messenger sein (Piper HM et al. 1998).

### 2.3 Thrombozyten

Thrombozyten spielen bei der Entstehung eines akuten Koronarsyndroms eine entscheidende Rolle. Ihre eigentliche Aufgabe ist die Sicherung der primären Hämostase und die Reparatur verletzter Endothelien. Kommt es in einem Koronargefäß im Rahmen einer atherosklerotischen Läsion zur Thrombozytenaktivierung, kann sich ein Thrombus bilden und zum Gefäßverschluss führen. Aus diesem Grund ist die Inaktivierung der Thrombozyten bei einem Myokardinfarkt ein wesentlicher Teil der Akuttherapie (Davi G, Patrono C 2007). Von besonderem Interesse bei der Therapie sind die für die intrazelluläre Signaltransduktion verantwortlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.

#### 2.3.1 Entstehung und Struktur

Der Thrombozyt ist ein flaches und unregelmäßiges Blutelement ohne Zellkern mit einem Durchmesser von 1 - 4 µm und einer Stärke von 0,5 - 1,5 µm.

Die Thrombozyten scheiden sich von Megakaryozyten ab. Diese polyploiden Riesenzellen, deren Durchmesser bis zu 0,1 mm betragen kann, zirkulieren nicht im Blut, sondern sind fest im Knochenmark verankert. Ihr Wachstum wird über Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel Thrombopoetin kontrolliert. Dieses Zytokin führt durch die Aktivierung des c-mpl Rezeptors zu einem vermehrten Ausschwemmen von Thrombozyten (Gurney AL et al. 1994). In Folge dieses Reizes bilden sich kleine Zytoplasmaabschnürungen des Megakaryozyten aus. Diese Zytoplasmaabschnürungen sind die eigentlichen Thrombozyten. Sie enthalten keine genomische DNA, besitzen aber einen Vorrat an messenger RNA (mRNA) und die für die Translation benötigte Proteinausstattung.

Nach der Abscherung der Thrombozyten durch den Blutstrom sind sie sofort funktionsfähig und zirkulieren frei im Blut (Behnke O et al. 1998). Thrombozyten haben im Schnitt eine mittlere Lebensdauer von 5 - 11 Tagen und werden in der Lunge, Leber und Milz nach Ablauf dieser Zeit abgebaut (George JN 2000). Aber nicht alle Thrombozyten bleiben im Blutstrom. Bis zu 1/3 aller Blutplättchen werden in der Milz sequestriert und können bei Bedarf freigesetzt werden.

Ein Thrombozyt besteht aus vier größeren Anteilen:

- a) Die Plasmamembran: Die äußere Hülle der Thrombozyten ist mit vielen Glykoproteinen assoziiert, die Enzym und Rezeptorfunktion haben und so für

## 2. Schrifttum

die verschiedensten Interaktionen mit der Umgebung oder mit anderen Thrombozyten zur Verfügung stehen.

- b) Das Hyalomer: So bezeichnet man das Zytoplasma des Thrombozyten. In ihm befindet sich die aus dem Megakaryozyten stammende mRNA, der dazugehörige translativ Apparat und etliche Mitochondrien (David G et al 2007).
- c) Das Zytoskelett: Das Hyalomer wird von Aktin-reichen Zytoskelett durchzogen. Dieses verleiht dem Thrombozyten Stabilität und ermöglicht eine aktive Verformung. Darüber hinaus gibt es eine größere Menge an internalisierten Membranpaketen, die ähnlich einer Reserve dicht verpackt und somit Platz sparend im Zytosol schwimmen (George JN 2000).
- d) Das Granulomer: Es ist ein dichtes tubuläres Membransystem im Inneren der Blutplättchen mit einer Vielzahl an Enzymen des Arachnoidonsäurestoffwechsels und weiteren zahlreiche anderen Granula.

Die Granula des Granulomers bilden eine sehr heterogene Gruppe mit den verschiedensten Funktionen. Die folgende Auflistung gibt einen kurzen Überblick über die wichtigsten Elemente:

- a)  $\alpha$ -Granula: Sie enthalten in Membranen verpackte prokoagulatorische Stoffe. Die meisten sind bereits im Zytoplasma des Megakaryozyten vorhanden und werden bei der Abspaltung mit übernommen. Darunter sind Faktoren wie zum Beispiel: Plättchenfaktor III und IV,  $\alpha$ -Thromboglobulin, Fibrinogen, Faktor IV und löslicher von Willebrand Faktor (vWF). Ein kleinerer Teil des  $\alpha$ -Granula stammt nicht aus den Megakaryozyten. Er wird durch Pinocytose aus dem Plasma aufgenommen. Zu den Stoffen, die auf diese Art in die Thrombozyten gelangen, zählen zum Beispiel Albumin, IgG und Fibronectin. Neben den prokoagulatorische Substanzen findet man in den Thrombozyten auch einige Wachstumsfaktoren wie Platelet derived growth factor (PDGF) und Platelet derived transforming factor (PDTF) (George JN 2000).
- b) Dichte Granula: Der Inhalt dieser Granula besteht aus lokal Thrombozyten aktivierenden Stoffen wie Serotonin, ATP, ADP, Kalium, Kalzium, Thromboxan  $A_2$  und diversen Katecholaminen.

## 2. Schrifttum

Lysosomen: Diese kleinen von Membranen eingeschlossenen Kompartimente sind mit vielen degradierenden Enzymen angereichert und können zur Desintegration von Zellbestandteilen genutzt werden.

### 2.3.2 Funktion

Die wesentliche Funktion der Thrombozyten ist die primäre Hämostase und die Endothelreparatur geschädigter Gefäße. Im Blutstrom sind Thrombozyten inaktiv und müssen am Bestimmungsort in die aktive Form überführt werden. Dieser Prozess verläuft regelrecht in vier Stufen. Aufgrund der großen Bedeutung der Thrombozytenaktivierung beim akuten Koronarsyndrom werden im folgenden Teil die einzelnen Phasen detaillierter besprochen:

#### 1. Adhäsion:

Durch die zufällige Berührung mit der Gefäßwand kommt es zum Kontakt mehrerer membranständiger Rezeptoren des Thrombozyten mit z.B. der freiliegenden subendothelialen Matrix eines verletzten Gefäßes. Welcher Rezeptor für den Erstkontakt sorgt, hängt von den Strömungsverhältnissen im Gefäß ab. Die rheologischen Bedingungen sind im menschlichen Körper sehr unterschiedlich. Im venösen System liegen die Scherkräfte unter  $500 \text{ s}^{-1}$  und bei Arteriolen erreichen sie ca.  $5000 \text{ s}^{-1}$ . Ist eine Arterie allerdings stenotisch, wie zum Beispiel in einem atherosklerotisch verengten Koronargefäß, steigert sich dieser Wert auf bis zu  $40000 \text{ s}^{-1}$  (Jackson SP 2007; Bluestein D et al. 1997).

- a) Bei geringen lokalen Scherkräften wird der Kontakt der Thrombozyten mit Fibrinogen, VWF und Fibronectin durch das Glykoprotein IIb/IIIa (auch Glykoprotein  $\alpha_{IIb}\beta_3$  genannt) hergestellt (Jackson SP 2007; Kulkarni S et al. 2000). Dieses Glykoprotein vermittelt im weiteren Verlauf der Thrombozytenaggregation die stärkste Bindung mit dem Gewebe über vWF, Fibronectin und Thrombospondin. Allerdings kann das Glykoprotein-IIb/IIIa diese festen Bindungen erst nach der Aktivierung des Thrombozyten ausbilden (George JN 2000).
- b) Werden die Strömungsverhältnisse stärker, gewinnt die Funktion des gefäßwandständigen von Willebrand-Faktor (vWF) an Bedeutung. Er kann über einen Kontakt zum GP-Ib-V-IX zur Fixierung beitragen. Günstig wirkt

## 2. Schrifttum

sich dabei die multimere Struktur mit den vielen Bindungsmöglichkeiten des vWF aus (Jackson SP 2007; Kulkarni S et al. 2000; Ruggeri ZM 2000).

- c) Ein weiterer Weg bei starker Strömung eine Adhäsion zu vermitteln ist, die Bindung über Fibronektin an GP-IIb/IIIa oder über Fibrinogen und Thrombospondin (Jackson SP 2007, David G et al 2007).

Darüber hinaus gibt es noch weitere Rezeptoren, die zum Kontakt des Thrombozyten mit der Zielregion führen, wie zum Beispiel die membranständigen Integrine Ia-IIa und VI. Sie vermitteln eine Adhäsion an freiliegendem und nicht Endothel gedecktem Kollagen (Nieswandt B et al. 2003). Ist die initiale Anlagerung einem Thrombozyten gelungen, kommt es zum engen Membrankontakt mit der Zielstruktur. Dabei beobachtete man, dass Thrombozyten ein ähnliches Verhalten wie Leukozyten aufweisen, um an den genauen Bestimmungsort zu gelangen. Sie binden an einer Stelle des Gefäßes und gleiten mit ihrer flachen Seite ein Stück weiter, um später an einem anderen Ort fest zu binden. Eine mögliche Erklärung für dieses amöboide Verhalten ist es, dass sie dem Blutstrom so weniger Angriffsfläche bieten (Kulkarni S et al. 2000, Maxwell MJ et al. 2007). Darüber hinaus können sich die Thrombozyten aber auch im Blutstrom plastisch verformen. Ihre langen Ausstülpungen können bei einem Eigendurchmesser von lediglich 4  $\mu\text{m}$  bis zu 30  $\mu\text{m}$  lang werden. Ermöglicht wird diese Eigenschaft durch die zahlreichen Reservemembranen des caniculären Systems im Innern des Thrombozyten (Dopheide SM et al. 2002).

### 2. Aktivierung und Sekretion:

Nach der initialen Adhäsion des Thrombozyten über die oben genannten Integrine kommt es zur G-Protein gekoppelten Signaltransduktion ins Innere des Blutplättchens. Unterstützend wirken dabei parakrine Substanzen wie der tissue-factor, Thrombin oder andere Metabolite. Diese werden von benachbarten Thrombozyten sezerniert bzw. vom geschädigten Endothel freigesetzt:

- a. Der tissue-factor ist eine Substanz, die nur von subendothelialen Zellen exprimiert wird und somit nur bei Gefäßverletzung in Kontakt mit Thrombozyten kommen kann. Thromboplastin oder Faktor III, wie man den tissue-factor ansonsten noch nennt, greift durch die Thrombinbildung auch in die extrinsische, plasmatische

## 2. Schrifttum

Gerinnungskaskade ein und vernetzt so die unterschiedlichen Wege der Hämostase.

- b. Thrombin oder auch Faktor IIa genannt ist ein Produkt der plasmatischen Gerinnungskaskade. Es ist der effektivste Thrombozytenaktivator und vernetzt die plasmatische Gerinnung mit der zellulären Gerinnung (Heemskerk JW et al. 2002). Freigesetztes Thrombin führt zu einer Aktivierung des Protease-Activated-Receptor-1 (PAR-1). Dieser ist sowohl an die G-Proteine der Gruppe  $G\alpha_q$  als auch an  $G\alpha_{12/13}$  gekoppelt. Sie sind von herausragender Bedeutung bei der Thrombozytenaktivierung, da sie mit bis zu 2000 Kopien auf jedem Thrombozyten vertreten sind und so zu einer massiven Verstärkung des Signals führen (Brass LF et al. 1992).

In Folge der durch die Adhäsion oder durch die Agonisten vermittelten Thrombozytenaktivierung kommt es zu einer intrazellulären Erhöhung der Kalziumkonzentration, die mit einer Formveränderung des Blutplättchens einhergeht (Rendu F et al. 2001). Gleichzeitig werden die im Thrombozyten eingeschlossenen Granula sezerniert. Die darin erhaltenen Stoffe bewirken auf autokrinem und parakrinem Wege eine weitere Aktivierung und eine verbesserte Aggregation des Thrombozyten und seiner Nachbarn. Neben der Beeinflussung der Thrombozyten üben die Stoffe auch eine Wirkung auf Zellen des Gefäßes aus. Erstens führen sie zur Vasokonstriktion und unterstützen somit die primäre Blutstillung. Zweitens locken sie Entzündungszellen an und drittens üben sie auch einen mitogenen Effekt auf das umgebene Gewebe aus (George JN 2000; Jackson SP 2007; Offermanns S 2006):

- a) Die im Thrombozyten gespeicherten Nukleotide ADP und ATP sind Agonisten für den P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor. Beide Rezeptoren sind wiederum an die G-Proteine  $G\alpha_q$  bzw.  $G\alpha_i$  gekoppelt. Deren Aufgabe liegt in der Verstärkung der Aggregation. Unterstützend wirkt dabei die gleichzeitige Freisetzung von ADP bzw. ATP aus den verletzten Zellen des Gewebes (Kulkarni S et al. 2000; Jackson SP 2007).
- b) Epinephrin löst in physiologischen Dosen selbst keine Aggregation aus. Es verbessert aber über einen ebenfalls G-Protein gekoppelten Effekt den Aggregationsprozess (Lauri D et al. 1985; Offermanns S 2006).

## 2. Schrifttum

- c) Thromboxan  $A_2$  wird durch die Cyclooxygenase-1 und -2 (COX 1/2) produziert und diffundiert durch die Zellmembranen zum Zielort. Dort kommt es zu einer Aktivierung der  $G\alpha_q$ -Rezeptoren. Ähnlich wie beim NO ist seine Wirkung durch eine geringe Halbwertszeit nur lokal begrenzt.
- d) Serotonin bewirkt bei intaktem Gewebe eine Vasodilatation, die einem Gefäßverschluss entgegenwirkt. Ist das Gefäß allerdings geschädigt oder besteht eine Endotheldysfunktion, kommt es zu einer starken Vasokonstriktion (Mc Fadden EP et al. 1991; Jackson SP 2007).
- e) Das vor seiner Entdeckung Endothelium-derived-relaxing-factor genannte Stickstoffmonoxid (NO) behebt nicht nur Gefäßspasmen, sondern begrenzt auch die Aktivierung von weiteren Thrombozyten. Es kann mühelos durch Gewebe diffundieren und seine Wirkung ist aufgrund der kurzen Halbwertszeit nur lokal beschränkt (Freedman JE et al. 1997).
- f) Der Faktor V/VIII unterstützt die Thrombusbildung durch die Aktivierung der plasmatischen Gerinnung.

Darüber hinaus gibt es noch eine ganze Reihe weiterer Stoffe, die an der Aktivierung der Thrombozyten beteiligt sind. Wie bereits oben angedeutet erfolgt bei einigen Agonisten die intrazelluläre Signaltransduktion durch eine Kopplung auf G-Proteine des Thrombozyten. Sie spielen sowohl bei der Aktivierung als auch der Sekretion eine ganz zentrale Rolle (Offermanns S et al. 1997; Offermanns S 2006).

### 3. Aggregation:

In der dritten Phase kommt es letztendlich zur Ausbildung einer festen Bindung der Thrombozyten untereinander und zur Thrombusformation bzw. festen Adhäsion mit dem beschädigten Gefäßlumen. Die oben beschriebene Signalkette mündet als gemeinsame Endstrecke dieses inside-out-signaling in die Aktivierung des IIb/IIIa-Glykoproteins (GP). Dieses Glykoprotein ist der Hauptrezeptor für eine stabile Adhäsion und Aggregation und spielt mit 40.000 bis zu 80.000 Kopien pro Plättchen auch zahlenmäßig eine herausragende Rolle. Im Zuge der Thrombozytenaktivierung kommt es zu einer Verformung des Rezeptors. Erst

## 2. Schrifttum

danach besitzt dieser optimale Bindungseigenschaften (Kulkarni S et al. 2000; George JN 2000; Jackson SP 2007; Wagner CL et al. 1996; Jackson Sp et al. 2003). Das GP-IIb/IIIa ist auch das Bindeglied zur plasmatischen Gerinnung, da es Fibrin fest binden kann und damit zu einer Quervernetzung von Thrombozyten und Fibrin führt. Hierfür ist es besonders gut geeignet, da Fibrinogen genau zwei Bindungsstellen besitzt und es so zur Verkettung von Thrombozyten beiträgt.

Die Aktivierung des IIb/IIIa-Glykoproteins unterliegt der Kontrolle der G-Proteine der  $G\alpha_q$  und  $G\alpha_{12/13}$  Klasse. Für die Endfestigkeit ist besonders der bereits oben beschriebene Kontakt mit Fibrinogen von Bedeutung (Ruggeri ZM 2002; Brass LF et al. 2005; George JN 2000; Kulkarni S et al. 2006; Jackson SP 2007).

Unterstützend wird dieser Prozess durch im Blut zirkulierenden Katecholamine, die ebenfalls via G-Protein gekoppelte Second Messenger den Umbau Prozesse stimulieren (Lauri D et al. 1985; Jackson SP 2007, Offermanns S 2006).

## 4. Inhibition

Um die Größe des entstehenden Thrombus zu beschränken und um eine überschießende Kettenreaktion der Gerinnung zu verhindern, besitzt das benachbarte intakte Endothel verschiedene der Thrombozytenaktivierung entgegenwirkende Mechanismen.

- a) Das intakte Endothel produziert am Rand einer Gefäßläsion Stickstoffmonoxid (NO). Dieses diffundiert in die Thrombozyten und führt zu einer Erhöhung des cyclischen Guanosinmonophosphat (cGMP). Dieser Second Messenger senkt den Kalziumspiegel im Thrombozyten und unterbindet damit die GP-IIb/IIIa Konformationsänderung. NO wird unter Verbrauch von NADPH durch NO-Synthasen (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin und Sauerstoff hergestellt.
- b) Durch die im Endothel befindliche Prostaglandin-I-Synthase wird aus Arachidonsäure Prostacyclin gebildet. Die Steuerung dieses Signals wird wiederum über das  $G\alpha_s$ -Protein vermittelt. Prostacyclin hemmt den Gefäßspasmus durch Erhöhung des intrazellulären cAMP und ist somit der Gegenspieler zum Thromboxan der Thrombozyten (Davi G et al 2007).



## 2. Schrifttum

- c) Die Gefäßwand besitzt Ecto-ADPasen, die zu einer Desintegration der Thrombozyten aktivierenden Metabolite ADP und ATP führen (Offermanns S 2006; George JN 2000).

### 2.3.3 Rolle der Thrombozyten im akuten Koronarsyndrom

Die Rolle der Thrombozyten beim Myokardinfarkt geht über die Bildung des Thrombus hinaus. Im Rahmen mehrerer Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass sie sowohl für die Entwicklung einer atherosklerotischen Läsion als auch für die Entstehung der Plaqueruptur verantwortlich sind.

Normales Endothel sezerniert antikoagulatorische Substanzen, die das Anheften von Thrombozyten unterbindet (Davi G et al. 2007). Liegt allerdings eine Endotheldysfunktion vor, exprimiert das Endothel Proteine, die eine Adhäsion von Thrombozyten fördern. Bei hohen Scherkräften, wie sie bei überhöhtem Blutdruck (Merten M et al. 2000) oder einem entzündlichen Prozess auftreten können, erfolgt eine erste Anlagerung über P-Selectin (Kulkarni S et al. 2000; Davi G et al. 2007). Es gibt Hinweise, dass diese Gewebe vermehrt wandständigen vWF exprimieren, der mit Ib-V-IX interagieren kann. Man beobachtet, dass Mäuse, die kein vWF besitzen, deutlich kleinere atherosklerotische Läsionen ausbilden (Methia N et al. 2001). Kommt es also zu einem ersten Kontakt, werden die Thrombozyten aktiviert und sezernieren Wachstumsfaktoren, chemotaktische Substanzen wie Il-1 $\beta$  und den CD-40 Liganden, prokoagulatorische Stoffe und weitere Substanzen, welche die Adhäsion begünstigen. Der CD-40 Ligand und Il-1 $\beta$  ermöglichen zum Beispiel eine deutlich erleichterte Immigration von Leukozyten und verstärken dadurch die Entzündungsreaktion. Desweiteren bewirkt die Sezernierung mitogener Stoffe ein vermehrtes Wachstum von Leukozyten und Fibroblasten. Das Endothel selbst wird dazu stimuliert, auf seiner Oberfläche ein anderes Adhäsions- Rezeptor Muster zu präsentieren. Es kommt zu einer Bindung von Monozyten und deren Aktivierung weitere Chemokine zu sezernieren. Sie differenzieren sich zu Makrophagen und schütten Proteasen wie MMPs, uPA und uPAR aus, die zu einer Desintegration des umgebenden Gewebes führt (Faraday N et al. 2001; Gawaz M et al 2005; Davi G et al. 2007). In Kombination mit den angelockten Leukozyten führt dies zu einem Aufflammen der Entzündungsreaktion in der Gefäßwand. Diese Entzündung verstärkt wiederum die Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten (Faraday N et al. 2001).

## 2. Schrifttum

So kommt es zu einem Progress der atherosklerotischen Veränderungen im Gefäß. Mit Zunahme der Plaques stenosierte das Gefäß und mit steigendem Grad der Entzündung wird die Plaque instabiler.

### 2.3.4 Mäuse und Menschen 1

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde an Mäusen durchgeführt. Trotz der offensichtlich großen Differenz zwischen beiden Spezies besteht bei den Thrombozyten eine gewisse Analogie, die im folgenden Kapitel dargestellt werden soll. Das menschliche Blutvolumen beträgt durchschnittlich fünf bis sechs Liter, das entspricht ca. 60 bis 70 ml pro kg Körpergewicht. Die Maus erreicht mit ungefähr 2,3 ml Gesamtblutvolumen und somit ca. 80 ml/kg Körpergewicht einen deutlich höheren Wert (Barbee RW et al. 1992). Auch besitzt sie mit im Mittel 1000 bis 1500  $\times 10^9 \text{ l}^{-1}$  Thrombozyten von einer Größe von ca. 0,5  $\mu\text{m}$  im Vergleich zum Menschen, der ca. 150 bis 400  $\times 10^9 \text{ l}^{-1}$  Thrombozyten mit einem Durchmesser von 1 bis 2  $\mu\text{m}$  besitzt, deutlich mehr Blutplättchen pro Volumeneinheit (Levin J et al. 1994; Baker GR et al. 1997).

Abgesehen von den Mengenverhältnissen und den unterschiedlichen Größen unterscheiden sich die Form und die äußere Struktur der Thrombozyten beider Spezies in der elektronenmikroskopischen Aufsicht kaum (Subramaniam M et al. 1996; Tsakiris DA et al. 1999). Auch der Inhalt ist miteinander gut vergleichbar. Mäuse Thrombozyten weisen lediglich ein in Form und Größe heterogeneres  $\alpha$ -Granula auf und besitzen geringere Mengen an dense Granula (Schmitt A et al. 2001).

Auf funktioneller Ebene gibt es kaum Differenzen, so dass sie sich als Modellobjekt sehr gut eignet. Thrombozyten der Maus und des Menschen besitzen dieselbe Ausstattung und Anzahl an Proteinen. So gibt es kaum Unterschiede in der Aktivierung und Adhäsion, da die Proteine ähnliche Funktionen übernehmen. Das für die Endfestigkeit besonders wichtige GP-IIb/IIIa zum Beispiel besitzt bei beiden Spezies die zentrale Position in der Aktivierung und späteren stabilen Aggregation. Auch die Ausstattung mit G-Proteinen ist gut miteinander vergleichbar (Tsakiris DA et al. 1999; Schmitt A et al. 2001; Nieswandt B et al. 2005). Aufgrund ihrer stark konservierten Form gibt es selbst im Vergleich mit den noch entfernter verwandten Intervertebraten kaum Unterschiede (Wilkie TM et al. 1992). Sowohl bei der Maus als

## 2. Schrifttum

auch beim Menschen findet man die G-Proteine der Klasse  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_{12}$  und  $G\alpha_{13}$ , aber kein  $G\alpha_{11}$  auf ihrer Oberfläche (Johnson GJ et al. 1996; Milligan G et al. 1993).

### 2.4 G-Proteine

In den vorherigen Kapiteln wurde die besondere Bedeutung der Thrombozyten bei der Genese des Myokardinfarktes beschrieben. Für deren Aktivierung und vollständigen Funktionsfähigkeit spielen die G-Proteine eine zentrale Schlüsselrolle.

#### 2.4.1 Struktur

Heterotrimere Guanin Nucleotid bindende Proteine (G-Proteine) sind eine Gruppe von Signaltransduktoren, die eine zentrale Stellung in der Signalübermittlung und Verarbeitung bei Säugetieren einnehmen. Mit einem Anteil von 2% am gesamten kodierten Genom gehören sie zu den häufigsten aller Proteine. Ihre Aufgabe ist es, ein Signal, das durch die verschiedensten extrazellulären aber auch intrazellulären Rezeptoren aufgenommen wird, an das Zellinnere zu vermitteln. Ihre Form ist hochkonserviert und findet sich in nur geringer Abwandlung in allen Lebewesen wieder. Diese Rezeptoren werden durch die unterschiedlichsten Hormone, Neurotransmittern, Chemokinen oder anderen autokrin und parakrin wirkenden Stoffen aktiviert und die eingehende Information mit Hilfe der G-Proteine durch die Zellmembran weitergegeben (Neves SR et al 2002; Offermanns S 2003; Wilkie TM 2000; Offermanns S 2001; Jiang Y et al. 1998; Neer EJ 1995; Offermanns S, Mancino V et al 1997).

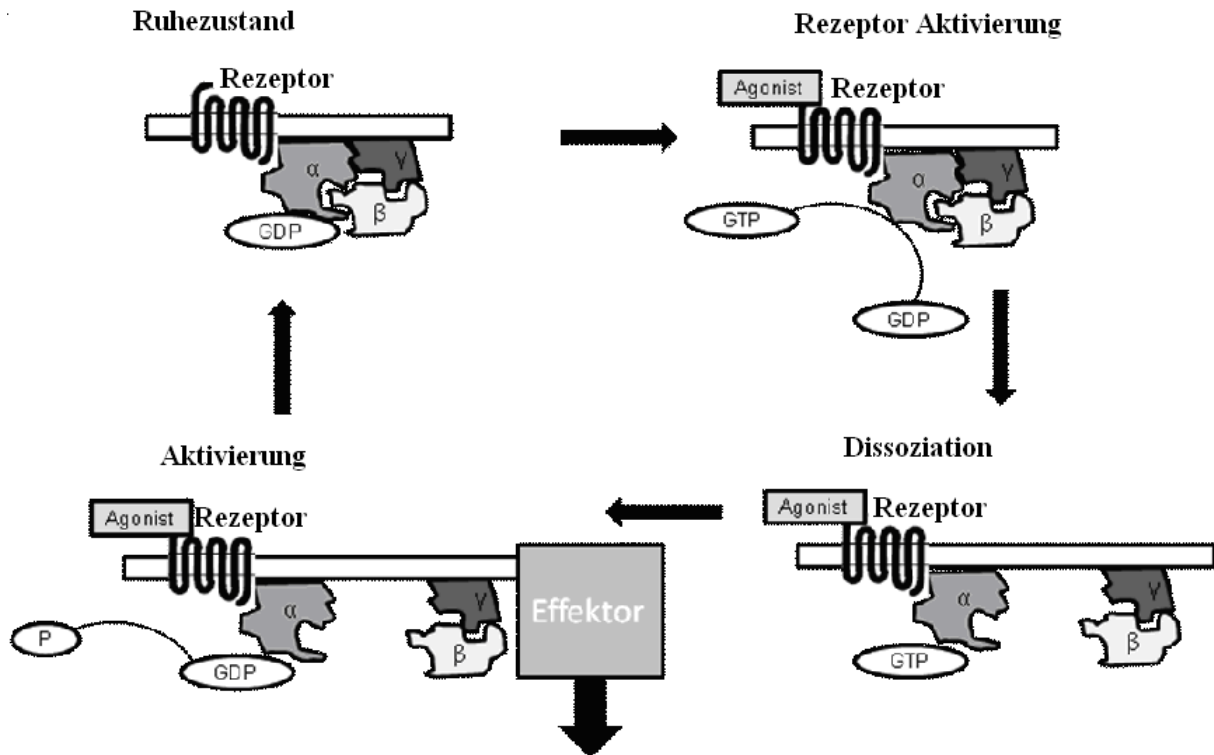
Extrazelluläre Signale werden durch eine Gruppe von Rezeptoren mit sieben transmembranären Durchgängen an die der Plasmamembran im Inneren der Zelle assoziierten G-Proteine weitergegeben (Neves SR et al. 2002). Das G-Protein kann darauf hin mit den verschiedensten Effektoren wie Enzymen, Ionen-Kanälen, Transportern oder anderen Mechanismen der zellulären Maschinerie direkt oder indirekt in Interaktion treten und Einfluss auf den Stoffwechsel, die Sekretion, Bewegung, Kontraktion oder die Transkription der Zelle nehmen. Aber G-Proteine nehmen nicht nur kurzfristig Einfluss auf eine einzelne Zelle, sondern können auch an Prozessen mitwirken, die das gesamte System beeinflussen. So spielen sie eine Rolle bei der embryonalen oder gonadalen Entwicklung, beeinflussen das Lernen und Gedächtnis, sorgen für die Homeostase und sind ein wichtiger Bestandteil der

## 2. Schrifttum

Apoptosemaschinerie (Offermanns S 2003; Offermanns S 2001; Wilkie TM 2000; Neves SR et al. 2002). G-Proteine sind aber nicht nur Transmitter, um extrazelluläre Signale ins Zellinnere zu vermitteln. Aufgrund ihrer variablen Sensitivität und der Möglichkeit, diese durch Regelmechanismen zu verändern, können sie je nach Bedarf Informationen prozessieren und modifizieren (Offermanns S 2003; Wilkie TM 2000; Neer EJ 1995).

Der Aufbau eines G-Proteins ist immer gleich. Sie setzen sich immer aus drei Untereinheiten zusammen. Diese bezeichnet man als  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ - Teil (Hepler JR et al. 1992; Neer EJ 1995). Im unerregten und nicht aktiven Zustand sind alle drei Teile assoziiert und bilden eine strukturelle Einheit. Die  $\alpha$ -Untereinheit bindet zusätzlich noch das Nukleotid Guanosindiphosphat (GDP). Die beiden  $\beta$ - und  $\gamma$ - Einheiten bilden eine funktionelle Einheit und liegen als undissoziierter Komplex vor. In dieser Wartestellung kann das G-Protein mit einem erregten Rezeptor interagieren. Sobald es zum Kontakt des Rezeptors mit dem G-Protein in der Zellmembran kommt, stößt die  $\alpha$ -Untereinheit das GDP ab und geht mit einem Guanosintriphosphat (GTP) eine neue Bindung ein. Diese Bindung bewirkt eine Konformationsänderung des  $\alpha$ -Fragments. Die verformte  $\alpha$ -Untereinheit trennt sich danach vom  $\beta\gamma$ -Komplex. Durch die Trennung können je nach Zielstruktur sowohl der  $\alpha$ - als auch der  $\beta\gamma$ -Teil ihren jeweiligen Effektor aktivieren. Um diesen aktiven Zustand zu beenden und um eine dauernde Aktivierung zu vermeiden, besitzt die  $\alpha$ -Untereinheit eine endogene GTPase Funktion. Dieses GTPase hydrolysiert GTP zu GDP unter Abspaltung eines Phosphatrestes. Dadurch kann die  $\alpha$ -Untereinheit wieder ihre ursprüngliche Konformation einnehmen. Somit kann es wieder zu einem Rearrangement von  $\alpha$ - und  $\beta\gamma$ -Untereinheit kommen. Damit hat das G-Protein wieder seinen inaktiven Zustand erreicht und der Zyklus kann von neuem beginnen (Neves SR et al. 2002; Offermanns S 2003; Wilkie TM 2000; Offermanns S 2001; Hepler JR et al. 1992; Neer EJ 1995).

## 2. Schritttum



**Abb. 2:** G-Protein Zyklus (modifiziert nach Offermanns S 2003)

Die Familie der G-Proteine setzt sich wie oben beschrieben aus drei Elementen zusammen. Von jedem dieser einzelnen Elemente hat man mittlerweile mehrere unterschiedliche Subgruppen identifiziert. Durch die variable Kombinationsmöglichkeit ergibt sich eine riesige Vielzahl an unterschiedlichen G-Proteinen mit unterschiedlicher Rezeptoraffinität, Transduktionskinetik und diversen second messenger. Insgesamt wurden bisher über 20  $\alpha$ -Untereinheiten, 5  $\beta$ -Untereinheiten und 12  $\gamma$ -Untereinheiten gefunden. Somit ergibt sich eine theoretische Kombinationsvielfalt von 1200 unterschiedlichen G-Proteinen (Neves SR et al. 2002; Offermanns S 2003; Offermanns S 2001).

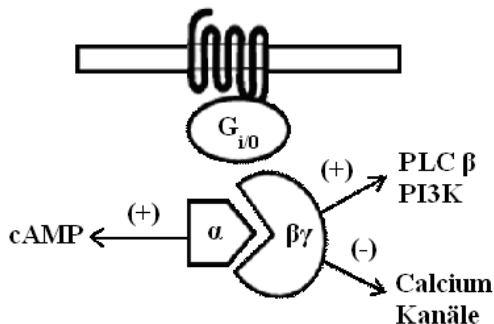
### 2.4.2 Funktion

Die einzelnen G-Proteine lassen sich trotz der theoretischen möglichen Vielfalt funktionell vier Familien zuordnen. Diesen Familien ist gemein, dass sie sich alle anhand ihrer  $\alpha$ -Untereinheit unterscheiden lassen. Die folgende Übersicht gibt einen kleinen, aber unvollständigen Überblick über die direkte Wirkung und das Vorkommen einzelner G-Protein Familien:

## 2. Schrifttum

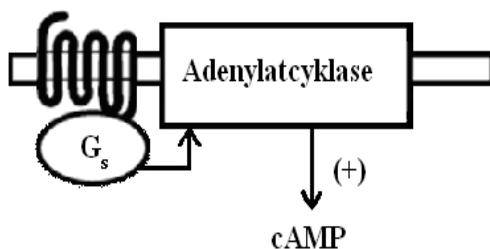
- a.  $G_{\alpha_{i/o}}$ -Familie: Diese Familie wird durch Mediatoren wie Epinephrin, Acetylcholin, Dopamin oder Serotonin angesteuert. Im aktiven Zustand bewirkt der  $\alpha$ -Teil über eine Inhibition der Adenylatzyklase eine Senkung des zytoplasmatischen cAMP-Spiegels. Von besonderer Bedeutung ist hier allerdings die  $\beta\gamma$ -Untereinheit. Sie nimmt Einfluss auf Kalziumkanäle vom P/Q N-Typ, aktiviert die Phospholipase-C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ), die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3-K) und nimmt damit Einfluss auf die mitogene ras Kinase, und auf GIRK-(Kalium)kanäle. GIRK-Kanäle sind zum Beispiel an der cholinerg muskarinischen Signaltransduktion beteiligt.

Die Proteine der  $G_{\alpha_{i/o}}$ -Familie beeinflussen unter anderem die Schrittmacheraktivität des Herzens und sind ein zentrales Element bei der Signaltransduktion im Rahmen der Lichtwahrnehmung.



**Abb. 3:** Kopplung der  $G_{\alpha_{i/o}}$ -Proteine

- b.  $G_{\alpha_s}$ -Familie: Ein typischer Vertreter von Rezeptoren, die auf diese G-Proteine koppeln sind die  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren. Sie kommen ubiquitär vor und spielen zum Beispiel eine große Rolle bei der Weiterleitung von Signalen in olfaktorischen sensorischen Neuronen. Eine typische Auswirkung ist das Anheben des intrazellulären cAMP-Spiegels, infolgedessen unter anderem die Proteinkinase-A aktiviert und auch der Kalziumspiegel gesenkt wird (Offermanns S 2003; Neves SR et al. 2002; Sunahara RK et al. 1996).



**Abb. 4:** Kopplung des  $G_{\alpha_s}$ -Proteins

## 2. Schrifttum

- c.  $G\alpha_{12/13}$ -Familie: Diese G-Protein Familie kommt ebenfalls ubiquitär vor. Da ihre Rezeptoren allerdings auch G-Proteine der  $G\alpha_q$ -Familie binden, ist es sehr schwer, ihre Selektivität und ihre konkrete Funktion zu ermitteln und deshalb ist sie weitgehend unbekannt (Gu JL et al. 2002).  $G\alpha_{12}$  zum Beispiel interagiert mit der Ras Kinase und Brutons-Tyrosin-Kinase (Btk), stimuliert die Phospholipase-D, c-Src und beeinflusst auf unbekanntem Weg die Proteinkinase-C. Durch diese Wirkung auf mitogene Proteine wurde man auf  $G\alpha_{12}$  zunächst als Protoonkogen aufmerksam.

$G\alpha_{13}$ : Wirkt ebenfalls auf den Zellzyklus, es beeinflusst über PYK2 zur PI3K und Akt schließlich NF $\kappa$ B (Shi CS et al. 2001). Letztere interagieren mit Cadherin und setzen Transkription Faktoren wie  $\beta$ -Catenin frei, die eine große Rolle in der Embryogenese spielen (Meigs TE et al. 2001). Entsprechende Knockoutmäuse versterben bereits während der intrauterinen Entwicklung, da ihr Endothel kein Gefäßsystem ausbilden kann. Dies ist vermutlich auf eine gestörte Migration der Zellen während der Angiogenese zurückzuführen (Offermanns S, Mancino V et al. 1997).

- d.  $G\alpha_{q/11}$ -Familie:

Diese Familie lässt sich wiederum in mehrere Subgruppen aufteilen:

$G\alpha_{11}$ -Proteine kommen ubiquitär vor. Sie werden unter anderem durch den auf Thrombozyten lokalisierten PYK2-Rezeptor erregt.

$G\alpha_q$ -Proteine sind ebenfalls ubiquitär vorhanden. Sie aktivieren die PLC- $\beta$ , die wiederum Phosphatidylinositol-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in DAG (Diacylglycerin) und IP<sub>3</sub> (Inositoltrisphosphat) spaltet. DAG aktiviert die PKC und die wiederum Raf, 1-Src, ras und die MAP-Kinasen (Lev S et al. 1995). IP<sub>3</sub> sorgt innerhalb der Zelle für eine Kalziumfreisetzung (Exton JH 1996; Rhee SG 2001). In Knockout Mäusen die kein  $G\alpha_q$  besitzen, beobachtet man eine geringere Größe, cerebelläre Ataxie und eine defekte Thrombozytenaktivierung (Offermanns S et al. 1997; Offermanns S et al. 1997).

Die Rezeptoren, die auf diese G-Proteinfamilie koppeln, unterscheiden nicht zwischen  $G\alpha_q$  und  $G\alpha_{11}$  (Wange RL et al. 1991, Offermanns S et al. 1994). Selbst die Endstrecke ihrer Aktivierung wie z.B. die Phospholipase-C- $\beta$  1,3,4 und die PLC- $\beta$ -2 ähneln sich sehr (Rhee SG 2001). Ihre Redundanz zeigt sich auch dadurch, dass Mäuse, die kein  $G\alpha_{11}$  exprimieren keinen auffälligen

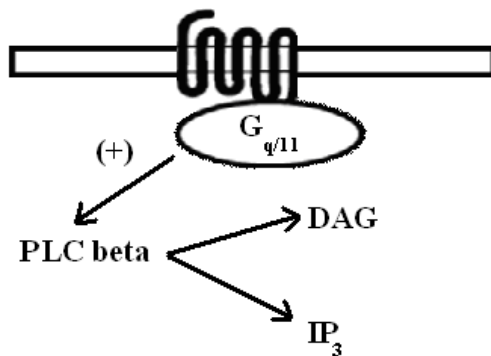
## 2. Schrifttum

Phänotyp haben (Offermanns et al. 1998). Typische Mediatoren der Rezeptoren sind neben Hormonen wie Angiotensin I und II, Endothelin und dem Platelet-activating-factor auch Nukleotide wie ADP und ATP.

Trotz der großen Ähnlichkeit innerhalb der G-Proteinfamilie koppelt ein einzelner Rezeptor jedoch relativ spezifisch auf das nachgeschaltete G-Protein. Dabei handelt es sich um den  $\alpha_1$ -Adrenorezeptor, der ausschließlich  $G_{\alpha_q}$  ansteuert.

$G_{\alpha_{15/16}}$ -Proteine kommen in hämatopoetischen Zellen vor (Offermanns S et al. 1998 (Murine); Shi CS et al. 2001 (Mensch)).

$G_{\alpha_{14}}$ -Proteine besitzen ihre Funktion insbesondere in Niere, Hoden und Lunge.



**Abb. 5:** Kopplung der  $G_{\alpha_{q/11}}$ -Proteine

Modulation der G-Proteine Aktivität:

Die Aktivität der G-Proteine kann über eine Klasse an Regulatoren, den RGS (Regulator of G-Protein signaling) gesteuert werden. Diese große Gruppe unterschiedlichster Polypeptiden besitzen alle eine hoch konservierte Domäne, die es ihnen ermöglicht, aktivierte  $G_{\alpha}$ -Untereinheiten zu binden. In diesem Zustand verhindern sie entweder die Bindung des GTP und damit die Aktivierung des G-Proteins oder limitieren die Bindungsdauer des GTP. Sie verstärkt die intrinsische GTP Hydrolyse der  $\alpha$ -Untereinheit bei den  $G_{\alpha}$ -Proteinen. Auf diese Art beendet es deren Aktivität frühzeitig (Wilkie TM 2000; Offermanns S 2003; Hollinger S, Hepler JR 2002). Neben den RGS gibt es noch einige andere Proteine, die auf die GTPase Aktivität Einfluss nehmen (Berstein G et al. 1992; Offermanns S 2003). Wie die verschiedenen Modulatoren der G-Proteine wiederum selbst gesteuert werden, ist hingegen noch weitgehend unbekannt.



### 2.4.3 G-Proteine in Thrombozyten

G-Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Aktivierung von Thrombozyten. Es lassen sich die  $G\alpha_i$ -,  $G\alpha_q$ - und  $G\alpha_{12/13}$ - G-Proteine in ihrer Zellmembran nachweisen. Aus der  $G\alpha_q$ -Familie finden sich allerdings sowohl beim Menschen als auch bei der Maus kein  $G\alpha_{11}$  (Jantzen HM et al. 2001; Milligan G et al. 1993). Ihr stärkster Aktivator ist das Thrombin, dass über den PARs-Rezeptor (Protease-activated-receptors) auf die G-Proteine  $G\alpha_{q/12/13}$  koppelt. Infolgedessen kommt es durch die PLC- $\beta$  zur Aktivierung der Thrombozyten. PLC- $\beta$  führt zu einer Erhöhung der Kalziumkonzentration, die in der Aktivierung des Blutplättchens gipfelt (Offermanns S et al. 1997).

Die besondere Bedeutung des  $G\alpha_q$  ließ sich bei Knock-out-Mäusen darstellen, die kein  $G\alpha_q$ -Protein exprimieren können. Sie haben trotz in Zahl und Form gleicher Thrombozyten eine beeinträchtigte primäre Hämostase, die sich in einer deutlich erhöhten Blutungszeit äußert. Der Defekt der Blutgerinnung ist so stark ausgeprägt, dass bereits viele Tiere postnatal an vermutlich intraabdominellen Blutungen versterben. Gleichzeitig besitzen sie aber einen gewissen Schutz vor durch Kollagen oder Adrenalin ausgelösten Thromboembolien. Die bei ihnen beeinträchtigte Aggregation und Sekretion lässt sich am besten anhand ihrer regulären Aktivierung durch den Agonisten ADP beschreiben. ADP bindet am P2Y1-Rezeptor und erhöht via  $G\alpha_q$  den zytoplasmatischen Kalziumspiegel. ADP ist dabei nicht nur ein direkter Agonist, sondern auch ein autokriner Verstärker der eigenen Aktivierung. Fehlt dieses positive Feedback, kommt es, wie im Fall der oben beschriebenen Mäuse, weder zu einer Aktivierung noch zu einer Sekretion des Thrombozyten. In normalen Mäusen ist ADP hingegen in der Lage, eine vollständige Aktivierung der Thrombozyten zu erzeugen, ohne aber zu einer Veränderung der Form zu führen (Offermanns S et al. 1997; Gachet C et al. 1997). Mediatoren wie Thromboxan- $A_2$  und Thrombin bewirken bei  $G\alpha_q$ -Knock-out-Mäusen allerdings eine Formveränderung, die anscheinend unabhängig von diesem Aktivierungspfad ist (Klages B et al. 1999; Offermanns S et al. 1997).

Ein weiteres wichtiges G-Protein bei der Aktivierung der Blutplättchen ist das  $G\alpha_i$ . Es wird ebenfalls durch ADP über den P2Y12-Rezeptor angesteuert. Blockiert man diesen Rezeptor irreversibel durch Clopidogrel, kommt es ebenfalls zu einer Verlängerung der Blutungszeit (Bhatt DL et al. 2003). Dementsprechend beobachtet

## 2. Schrifttum

man bei der Reaktion von  $G\alpha_i$ -Knock-out-Thrombozyten auf ADP eine deutlich verlängerte Reaktionszeit (Jantzen HM et al. 2001). Das Katecholamin Epinephrin ist ebenfalls ein Agonist des  $G\alpha_i$ -Proteins. Es koppelt ebenfalls über den  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor auf  $G\alpha_i$  und potenziert die Wirkung anderer Botenstoffe.

Für die korrekte Funktion der Thrombozyten sind G-Proteine unerlässlich. Sie sind für die Mehrzahl der Aktivierungsschritte der Thrombozyten verantwortlich. Dazu zählt insbesondere die Konformationsänderung des zentralen GP-IIb/IIIa-Rezeptors. Ohne diesen Rezeptor ist eine dauerhafte und stabile Aggregation nicht möglich.

### 2.4.4 G-Proteine im Herzen

Embryonal: Bereits in der embryonalen Entwicklung des Herzens sind G Proteine von großer Wichtigkeit.  $G\alpha_q$ - und  $G\alpha_{11}$ -Doppelknockoutmäuse versterben intrauterin am zehnten Tag ihrer Entwicklung. Ihre Endothelzellen bilden keine Gefäße aus. Ist aber nur ein einziges Allel intakt, sind die Mäuse lebensfähig (Offermanns S et al. 1998).

Autonome Regulation:  $\beta$ -adrenerge Erregung im Herzen ist an  $G\alpha_s$  gekoppelt. Es führt zu einem Anstieg von cAMP und damit einer Aktivierung der PKA. Desweiteren nimmt es Einfluss auf L-Typ-Kalziumkanäle und den Phosphorylierungszustand von Troponin-I (Bers DM 2002). Eine Überexpression von  $G\alpha_s$  in Mäusen erhöht im Vergleich mit dem Wildtyp bei der Ausschüttung von Katecholamin deutlich die Inotropie und Chronotropie (Iwase M et al. 1997). Aber auch auf die parasympathische Regulation nehmen G-Proteine Einfluss.  $M_2$  muskarinische Acetylcholinrezeptoren koppeln auf das  $G\alpha_{i/o}$ -Protein, das über die  $\beta\gamma$ -Untereinheit auf die inward rectifier Kaliumkanäle wirkt. Reduziert man bei Mäusen die Aktivität der  $\beta\gamma$ -Einheit um 50%, ist die parasympathische Regulation des Herzens deutlich eingeschränkt (Gehrmann J et al. 2002).

Myokardiale Hypertrophie: Für die Entstehung der myokardialen Hypertrophie gibt es derzeit zwei Erklärungsmodelle. Die erste Theorie geht davon aus, dass eine chronische sympathische Stimulation der G-Proteine zu einer Kardiomyopathie führt. Beispielsweise entwickelten  $G\alpha_s$  überexprimierende Mäusen bereits nach kurzer Zeit eine Kardiomyopathie (Iwase M et al. 1997). Die zweite Theorie macht einen kompensatorischen Wachstumsreiz bei anhaltender mechanischer Belastung für die myokardiale Hypertrophie verantwortlich. Bestimmte Hormone wie Noradrenalin,

## 2. Schrifttum

Endothelin und Angiotensin-II, die bei erhöhtem Sympatikusonus oder mechanischem Stress ausgeschüttet werden, interagieren mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren und können so den Wachstumsreiz auslösen:

Agonist	Rezeptor	G-Protein
Ang-II (Angiotensin-II)	AT1	G $\alpha_q$
ET-1 (Endothelin-1)	ETA	G $\alpha_q$ / G $\alpha_i$
PGF2a (Prostaglandin-F2a)	PGF	G $\alpha_q$
PE	$\alpha_1$ -Adrenerge Rezeptor	G $\alpha_q$
Thrombin	PAR-1	G $\alpha_q$ / G $\alpha_i$
Ne (Norepinephrin)	$\alpha_1$ -Adrenerge Rezeptor	G $\alpha_q$
ISO (Isoprenalin)	$\beta_1, \beta_2$ -Adrenerge Rezeptor	G $\alpha_s$

**Abb. 6:** G-Protein gekoppelte Rezeptoren: Regulation des Kardiomyozyten Wachstum nach Adams JW et al. 2001

G $\alpha_q$ : In Mäusen führt eine G $\alpha_q$ -Überexpression zu einer Hypertrophie des Myokards (D'Angelo DD et al. 1997). Inhibiert man G $\alpha_q$  durch ein bestimmtes Medikament, welches den Kontakt zwischen Rezeptor und G-Protein verhindert, entwickeln Mäusen mit einer chirurgisch erzeugten Aortenkonstriktion im Gegensatz zur Kontrollgruppe deutlich seltener eine Herzhypertrophie (Akhter SA et al. 1998). Ähnliches lässt sich in Tieren beobachten, die im Herzen kein G $\alpha_q$  und G $\alpha_{11}$  exprimieren. Sie bilden nach einer Aortenkonstriktion ebenfalls keine Hypertrophie, obwohl sie nach der Operation einer erheblichen mechanischen Belastung ausgesetzt sind (Wettschurek N et al. 2001). Die G-Proteine G $\alpha_q$  und G $\alpha_{11}$  mit ihrem identischen Signalweg über die PLC- $\beta$  sind also wesentlich an der Genese der Herzhypertrophie und der Kardiomyopathie beteiligt. Darüber hinaus ist das G $\alpha_q$ -Protein auch beim Remodeling nach einem Herzinfarkt von Bedeutung. Es finden sich in den Randgebieten einer Infarktzone vermehrt G $\alpha_q$ -Proteine auf den Myokardiozyten und die PLC- $\beta$  Aktivität ist deutlich hochreguliert (Ju H et al. 1998).

G $\alpha_s$ : Die Erregung erfolgt über  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Adrenorezeptoren. Bei einer Überexpression von G $\alpha_s$  im Herzen kommt es aber in Areale mit hoher G $\alpha_s$ -Dichte zu einer Hypertrophie. In Gebieten mit physiologischem Expressionsmuster findet

## 2. Schrifttum

man hingegen nahezu ausschließlich normal entwickelte Zellen (Vatner DE et al. 2000). In einer Untersuchung transgener Mäuse mit 24- bis 46-fach erhöhten  $\beta_1$ -Adrenorezeptoren Überexpression entwickeln die Tiere zuerst eine Hypertrophie und im weiteren Verlauf eine Kardiomyopathie. Der finale Zelluntergang geschieht durch Apoptose. Diese Beobachtung stützt sich auf TUNEL-(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) assays zur Messung der Apoptoseaktivität der Mäuseherzen (Bisognano JD et al. 2000).

$G\alpha_i$ : Es gibt wenige Hinweise auf eine Hypertrophieinduktion durch dieses G-Protein, obwohl  $G\alpha_i$  die gleichen Agonisten wie  $G\alpha_q$  besitzt (Adams JW et al. 1998).

$G\alpha_{12/13}$ : In neonatalen Ratten führt eine  $\alpha_1$ -Adrenorezeptoraktivierung sowohl über  $G\alpha_q$  als auch über  $G\alpha_{12/13}$  zu einer Hypertrophie des Myokards (Maruyama Y et al. 2001).

### Apoptose:

Terminal differenzierte Kardiomyozyten reagieren auf Wachstumsreize mit Apoptose (Katz AM 1995). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass es zu einer kurzfristigen Adaptation über die Hypertrophie kommt, aber langfristig die Wachstumsstimuli zur Apoptose führen (Adams JW et al. 2001; Adams JW et al. 1998). Werden Wachstumsfaktoren wie E2F-1 oder andere Transkriptionsfaktoren durch adenoviralen Gentransfer in Kardiomyozyten hochreguliert, zeigt sich sowohl in vitro als auch in vivo ein deutlicher Anstieg der Mortalität und eine erhöhte Apoptoserate (Agah R et al. 1997). Ein möglicher Signalweg führt hierbei über die Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und JNK, die bei der  $G\alpha_q$  induzierter Apoptose beteiligt sind (Adams SW et al. 1998).

$G\alpha_q$ : Angiotensin-II induziert die Apoptose in neonatalen Rattenkardiomyozyten über eine Stimulation der PLC- $\beta$  (Kajstura J et al. 1997; Cigola E et al. 1997). Als Gegenbeweis verhindert Losartan, ein Antagonist am Angiotensin-1-Rezeptor und der Effektor des Angiotensin-II, die Apoptose in den Zellen (Cigola E et al. 1997). Eine anhaltende Aktivierung von  $G\alpha_q$  und eine Stimulation der PLC- $\beta$  führt in neonatalen Rattenkardiomyozyten deshalb zur Apoptose (Kajstura JW et al. 1998).

$G\alpha_s$ : Untersuchungen von Patienten mit Herzinsuffizienz stellten einen erhöhten Katecholaminspiegel in deren Plasma fest (Hasking GJ et al. 1986). Katecholamine sind Agonisten des  $G\alpha_s$ -Proteins. Weitere Versuche mit Rattenzellen zeigten, dass erhöhte Konzentrationen an Noradrenalin über eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation zur

## 2. Schrifttum

Apoptose der Cardiomyozyten führen (Communal C et al. 1998, Yukitaka S et al. 1998). Dabei scheint insbesondere der  $\beta_1$ -Rezeptor von Bedeutung zu sein (Zaugg M et al 2000). So entwickeln transgene Mäuse mit aktivem  $\beta_1$ -Rezeptor eine Herzinsuffizienz und viele ihrer Herzmuskelzellen gehen in Apoptose (Engelhardt S et al. 1999). Blockiert man aber die  $\beta$ -Rezeptor der Zelle durch Propranolol, kann man sowohl die Apoptose als auch die Herzinsuffizienz verhindern (Asai K et al. 1999).

### 3. Material

#### 3.1 Chemikalien, Medien, Puffer, Lösungen

Chemikalien:

Isofluran (Forene <sup>®</sup> )	Abott, D
----------------------------------	----------

Tyrode-Lösung:

NaCl	121 mM	Sigma-Aldrich, D
NaHCO <sub>3</sub>	5 mM	Sigma-Aldrich, D
HEPES	10 mM	Sigma-Aldrich, D
KCl	4,7 mM	Sigma-Aldrich, D
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM	Sigma-Aldrich, D
MgSO <sub>4</sub>	1,2 mM	Sigma-Aldrich, D
Glucose	15 mM	Sigma-Aldrich, D
BDM	15 mM	Sigma-Aldrich, D

Die Lösung mittels HCl bzw. NaOH bei 37°C auf einen pH-Wert von 7,35 titrieren.

Kollagenasen-Puffer:

Tyrode-Lösung	50 ml	
Kollagenase II	50 mg	Boehringer, D
CaCl <sub>2</sub> (100mM)	6,25 µl	Sigma-Aldrich, D

Stop-1-Puffer:

Tyrode-Lösung	9 ml	
BCS	1 ml (10%)	Sigma-Aldrich, D
CaCl <sub>2</sub> (100mM)	12,5 µl	Sigma-Aldrich, D

Stop-2-Puffer:

Tyrode-Lösung	28,5 ml	
BCS	1,5 ml (5%)	Sigma-Aldrich, D
CaCl <sub>2</sub> (10mM)	37,5 µl	Sigma-Aldrich, D

### 3. Material

#### Zellkulturmedium:

RPMI Medium 164040 ml	Gibco, USA
Nicht essentielle Aminosäuren 0,5 ml	Gibco, USA
10 mg/ml Insulin 20 µl	Novo Nordisk, D
100 IU/ml Penicillin (100 IU/ml)	Sigma-Aldrich, D
100 mg/ml Streptomycin (100 IU/ml)	Sigma-Aldrich, D
BCS (Bovines Kälber Serum) 7,5% 3 ml	Gibco, USA
BDM (2,3 Butanedione monoxide) 2,5% 0,5 ml	Gibco, USA
NaHCO <sub>3</sub> 0,5 ml	Sigma-Aldrich, D

Inkubation der Lösung im Brutschrank in humider Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 2 h bis zum Versuch.

#### Anoxiemedium:

Zellkulturmedium (s.o.) 100 ml	
Natriumdithionid (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) 8,7 mg	Merck, D
(hohe Instabilität: Anoxiemedium wird unmittelbar vor jeder Anoxie frisch angesetzt; Menge um ausreichende Sauerstoffelimination zu gewährleisten bei zunehmenden Alter der Substanz variabel)	

#### Zellkulturplatten:

Gekammerte sterile Glas Objektträger (chamber slides) Lab Tek™ II	Nunc, USA
10 ml PBS	Sigma-Aldrich, D
Laminin	Sigma-Aldrich, D

Laminin wird in PBS aufgelöst, so dass eine Lösung mit einer Konzentration von 10 µg/ml entsteht. Anschließend wird 1,5 ml der Lösung auf den Zellkulturplatten aufgetragen und diese im Brutschrank bei 37°C für 2 h inkubiert. Im nächsten Schritt saugt man die Lamininlösung mit einer Pipette ab. Auf der Oberfläche der Zellkulturplatte haftet danach eine Lamininschicht mit einer ungefähren Dichte von 5-10 mg/cm<sup>2</sup>.

Um eine ausreichende Anzahl an lebenden Kardiomyozyten zu gewinnen, werden alle Lösungen und Medien am Tag des Versuches frisch angesetzt.

### 3. Material

Alle verwendeten Chemikalien wurden in der höchsten Qualität bezogen und gemäß Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

#### 3.2 Geräte und Laborbedarf:

Auflichtmikroskop (IDO3)	Carl Zeiss, D
Blutgasanalysegerät (Rapid Lab 860)	Siemens, D
Brutschrank 1	Heraeus, D
Brutschrank 2 (Anoxie)	Heraeus, D
DNeasy <sup>®</sup> Tissue Kits DNeasy <sup>®</sup> Tissue Kits	Qiagen GmbH, D
Dissektionsmikroskop JKH Fibermatik	Edward Weck, USA
Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 25)	Carl Zeiss, D
Langendorf-Perfusionsanlage	Eigenbau
life / dead kit (viability / cytotoxicity Kit L 3224)	Molecular Probes, D
Marker 100 bp	New England Biolabs GmbH, D
Nylonnetz	Eigenbau (Strumpfhose)
Photometer DU <sup>®</sup> 640	Beckmann GmbH, USA
Plexiglasinhalationskammer	Eigenbau
Primer Mix	MWG Biotech, D
Radiometer	Copenhagen, D
Millex GV Sterile Filter 0,22 µm	Millipore, Irland
Sterile Werkbank (Herasafe)	Heraeus, D
Thermocycler Mastercycler <sup>®</sup> Gradient	Eppendorf, D
Titanium <sup>™</sup> Taq PCR Kit	BD Biosciences, D
UV-Tisch	MWG Biotech, D
Wärmepumpen (Umwälzthermostat D8)	Haake , D

#### 3.3 Versuchstiere:

Die Verwendung von Mäusen als Modellorganismus ist weit verbreitet und ermöglicht in vivo Einblicke in physiologische und pathologische Vorgänge. Auf der Ebene des Hämatologischen und Kardiovaskulären Systems gibt es zwischen Maus und Mensch besonders viele strukturelle und funktionelle Homologien, so dass sich hier



### 3. Material

Mäuse als Versuchsobjekte besonders gut eignen. Daneben gibt es noch eine Reihe weiterer Vorteile dieses Modellorganismus. Eine kurze Tragezeit, die hohe Fertilität und die geringen Haltungskosten machen die Mäusehaltung auch aus ökonomischer Sicht sinnvoll. Aber insbesondere das große Wissen über das Mäusegenom und Proteom und die relative Einfachheit der genomischen Manipulation machen sie zu einem exzellenten Versuchstier. Leider erschwert die geringe Größe chirurgische Manipulationen (Doevendans PA et al. 1998; Nieswandt B et al. 2005).

Zu den Tierversuchen stehen Wildtypzuchtpärchen (+/+) mit dem genetischen Hintergrund 129/Sv J/C57 B1 6J und  $G\alpha_q$ -Knock-out-Mäuse (-/-) mit dem gleichen genetischen Hintergrund zur Verfügung. Die Wildtypmäuse wurden von Charles River, Frankreich bereitgestellt und die Knock-out-Tiere erhielten wir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Stefan Offermanns (Ruprechts Karls Universität Heidelberg). Die Deletion des  $G\alpha_q$ -Proteins führte Offermanns an 129Sv embryonalen Stammzellen durch und kreuzte diese mit einem C57/BL-Stamm um robustere Tiere zu erhalten (Offermanns S, Hashimoto K et al. 1997). Die eingefügte Deletion führt dazu, dass keine  $\alpha_q$ -Untereinheit exprimiert wird und so das G-Protein funktionslos ist (Offermanns S, Hashimoto K et al. 1997).

Phänotyp:  $G\alpha_q$ -Mäuse (-/-) sind überlebensfähige Tiere, deren Phänotyp bereits an verschiedenen Stellen beschrieben wurde ( Offermanns S, Hashimoto K et al. 1997; Offermanns S, Toombs CF et al. 1997; Offermanns S 2001). Sie haben eine deutlich verlängerte Blutungszeit, sind ataktisch und weisen eine motorische Diskoordination auf.

Haltung: Es werden maximal acht Tiere in Makrolonkäfigen gehalten, deren Boden mit Einstreu belegt ist. Ihnen steht autoklaviertes Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Die Raumtemperatur beträgt 20°C mit einer Humidität von 60% bis 70%. Der Hell-Dunkel-Rhythmus erstreckte sich über 12 h. Die Helligkeit beträgt am Tag 50 bis 100 Lux. In der Nacht herrscht völlige Dunkelheit.

Die tierexperimentelle Studie wurde gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

Genotypisierung: Zur Differenzierung der nachgezüchteten Mäuse zwischen Wildtyp (+/+), heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-)  $G\alpha_q$ -Mäusen wird den jungen Tieren unter Isofluran Kurznaarkose ein Stück der Schwanzspitze abgeschnitten. Gemäß einem Protokoll von S. Offermanns erfolgt anschließend die Genotypisierung im Katecholaminlabor der 1. Medizinischen Klinik des Klinikum rechts der Isar. Aus dem

### 3. Material

Schwanzfragment gewinnt man mit Hilfe des DNeasy<sup>®</sup> Tissue Kits die DNA nach Anleitung des Herstellers und amplifiziert sie im nächsten Schritt mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR). Die Konzentration der DNA im Ausgangspuffer lässt sich in einem 1:10 mit aqua destillata verdünnten Evaluationspuffer durch ein Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmen. Die gemessene Extinktion multipliziert mit 500 ergibt die Konzentration der DNA im Puffer in µg/ml. Mit 100 ng der Probe und dem Titanium<sup>™</sup> Taq PCR Kit lässt sich die PCR durchführen. Die DNA Probe wird mit 2,50 µl 10x PCR Puffer, 2,00 µl dNTO, 0,75 µl Primer Mix (QIN7A: 5'-CTG GTT AGG AGC TCA GCT CTG AAG-3', QNEO: 5'-TTC AAA GTA TCA CAC TCA CAT CAC AG-3', TW37: 5'-TGC CTG CTG CTT GCC GAA TAT CAT GG-3', und Aqua destillata ad 25 µl sowie 0,2 µl Taq-Polmerase in einem Thermocycler 3 min bei 94°C inkubiert. Nach dreißig Amplifikations schritten und einer zehn minütigen Inkubation bei 72°C wird die DNA auf ein 1% Agarose gel aufgetragen. Dann werden in zwei Geltaschen eine Negativ- und eine Positivkontrolle pipettiert. Im letzten Schritt trägt man zur Abschätzung der DNA-Längen je 1 µl von definierten Markern mit jeweils 100 Basenpaaren (bp) auf. Nach einer Laufzeit von 3 bis 4 Stunden werden die entstandenen Banden auf einem UV-Tische abgelesen. Banden mit einer Länge von 500 bp entsprechen einem wt- Allel (primer : QIN 7A/QNEO), Banden mit lediglich 300 bp entsprechen einem Knockout-Allel (Primer TW37/QNEO). Der Genotyp einer untersuchten Maus kann somit einfach ermittelt werden. Die einzelne Bande einer Wildtypmaus (+/+) liegt bei 500 bp. Ein homozygote Maus (-/-) besitzt ebenfalls nur eine Bande bei 300 bp. Hingegen hat ein heterozygoten Tier (+/-) sowohl eine Bande bei 300 bp als auch eine Bande bei 500 bp

### 3.4 Mäuse und Menschen 2

Herz: Auf anatomischer Ebene ähneln sich Säugetierherzen sehr. Trotz des immensen Größenunterschiedes (die Masse einer Maus entspricht lediglich 0.05% der Masse eines Menschen) unterscheidet sich ihr makroskopischer Aufbau kaum. In der Gefäßversorgung gibt es allerdings kleine Unterschiede (Doevendans PA et al. 1998).

Mensch: Das menschliche Herz wird durch zwei Hauptgefäße versorgt. Die Arteria (A.) coronaria sinister teilt sich in den Ramus (R.) circumflexus (left circumflex coronary artery, LCX) und den R. interventricularis anterior (left anterior descendes coronary artery, LAD) auf. Sie versorgen den linken Vorhof, den Großteil des linken Ventrikel, das vordere mittlere Septum und einen kleinen Anteil des rechten Ventrikel. Der zweite Hauptstamm, die A. coronaria dexter teilt sich auf in einen R. marginalis dexter und einen R. interventrikularis posterior. Ihr Versorgungsbereich betrifft den rechten Vorhof, den Großteil des rechten Ventrikels, den Bereich des Atrioventrikular- (AV) und Sinusknoten, das hintere Septum und einen kleinen Bereich des linken Ventrikels. Bei der Versorgung der Hinterwand des linken Ventrikels gibt es eine Reihe interindividueller Unterschiede. Bei 70% der Menschen, dem sogenannten Normalversorgertyp, findet man den R. interventrikularis posterior, der mit der A. coronaria dexter verbunden ist. In 20% der Fälle fehlt dieses Gefäß. Dafür besitzt dieser Linksversorgertyp einen verlagerten R. interventrikularis anterior aus der A. coronaria sinister. Der Rechtsversorgertyp ist bei 10% der Menschen zu finden (Bültmann BD et al. 2004).

Maus: Die Gefäßarchitektur ist der des Menschen sehr ähnlich, allerdings besitzt die A. coronaria sinister eine Besonderheit. Aus ihr spaltet sich neben der LAD auch ein großer septaler Ast ab. Kommt es zum Verschluss der LAD, entwickeln Mäuse folglich einen viel kleineren Infarkt als Menschen. Das menschliche Septum wird direkt über die LAD versorgt. Neben dieser Besonderheit wird die Existenz eines R. circumflexus bei Mäusen diskutiert. Bisher wurde aber nur ein marginal entwickeltes Gefäß gefunden (Doevendans PA et al. 1998; Michael LH et al. 1995).

Die wichtigste Gemeinsamkeit von Menschen und Mäuseherzen liegt in der schlecht ausgeprägten Kollateralversorgung. So ist durch den Verschluss eines einzelnen Gefäßes ein Infarkt möglich (Ahn D et al. 2004; Michael LH et al. 1995). Weitere

## 4. Methoden

Unterschiede finden sich natürlich in Gewicht und Größe: Das menschliche Herz wiegt ca. 250 bis 300 g ein Mäuseherz lediglich 2 bis 3 g.

Kardiomyozyten: Das Mäuseherz besteht aus  $10 \times 10^6$  Kardiomyozyten, die ein Volumen von jeweils  $1,5 \mu\text{m}^3$  haben. Das ergibt ca. 90% des Herzvolumens. Von der Gesamtanzahl aller Herzzellen machen die Kardiomyozyten allerdings nur 15% aus. Die restlichen Zellen sind vorwiegend interstitielle Zellen (Doevendans PA et al. 1998; Soonpaa MH et al. 1996). Das Mäuseherz hat eine viel höhere Stoffwechselleistung als das menschliche Herz. Besonders deutlich wird diese Beobachtung durch die unterschiedliche Mitochondriendichte. Bei Mäusen nehmen diese bis zu 37,9% des Zellvolumens ein, beim Menschen sind es lediglich 25,3% (Barth E et al. 1992).

## 4. Methoden

### 4.1 Ischämie adulter Kardiomyozyten

Ziel dieser Untersuchung ist es, die Anoxietoleranz von  $G\alpha_q$ -Knock-out-Kardiomyozyten zu untersuchen. Um dies unter möglichst kontrollierten Bedingungen und unabhängig von blutzellulären Bestandteilen durchführen zu können, werden die Kardiomyozyten zunächst isoliert und anschließend in Zellkultur kultiviert.

#### 4.1.1 Herzentnahme

Das Alter der Versuchstiere liegt zwischen 15 und 30 Wochen. Von jeder Versuchsgruppe werden je drei (+/+) bzw. (-/-) Tiere geopfert. Über eine selbst gebaute Inhalationskammer aus Plexiglas begast man die Mäuse, indem man die einströmende Luft mit 5% Isofluran anreichert. Das Narkosegas wird mit Hilfe eines Flowmeter zusätzlich mit  $0,5 \text{ l min}^{-1}$  Sauerstoff vermischt. Nach dem Verlust des Stellreflexes werden die Versuchstiere durch Druck einer Pinzette auf den Hals fixiert und durch gleichzeitiges ruckartiges Ziehen das Genick gebrochen. Anschließend wird die Maus in Rückenlage durch Klebestreifen fixiert. Im nächsten Schritt wird das Herz durch eine longitudinale Sternotomie freigelegt. Jetzt durchtrennt man mit einer Schere den Hilus und kann das freiliegende Herz aus dem Thorax entnehmen und in eine bereitstehende Petrischale legen. Diese wurde vorher mit einer  $3^\circ\text{C}$  bis  $5^\circ\text{C}$  kalter Tyrode-Lösung gefüllt. Zwischen Petrischalenboden und Herz befindet sich

## 4. Methoden

eine kleine sterile Kompresse, um ein Verrutschen des Herzens während der weiteren Manipulation zu verhindern.

Nach der operativen Entfernung des Herzens fädelt man im nächsten Schritt das Herz auf eine Stahlkanüle, um die anschließende Langendorffperfusion zu erleichtern. Hierfür wird mit Hilfe eines Dissektionsmikroskops ein Polyethylenschlauch, dessen eines Ende zuvor an einer Stahlkanüle befestigt wurde, in die freiliegende Aorta ascendens eingeführt. Zur Fixation umschlingt man nun die Aorta und den Polyethylenschlauch mit einem Faden (8.0 Prolene) und fixiert das Bündel durch mehrere Knoten fest miteinander. Das an der Kanüle befestigte Herz kann nun mit einer 5 ml Spritze und ca. 5 ml ungefähr 5°C kalter Tyrode-Lösung durchspült werden, um restliches Blut zu entfernen und mögliche Ischämieschäden durch eine Stoffwechselreduktion zu verringern. Insgesamt benötigt man für die Herzentnahme bis zur weiteren Perfusion im Schnitt ca. 5 bis 8 Minuten.

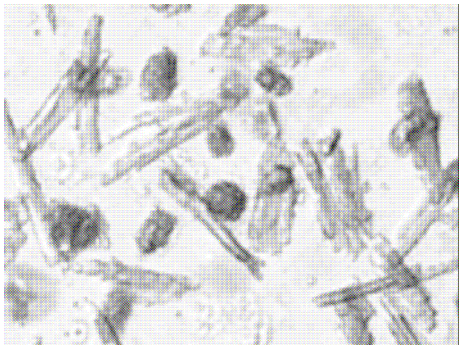
### 4.1.2 Isolation der Zellen

Zur Isolation der Kardiomyozyten aus dem Herzen wird eine selbstgebaute Langendorff-Perfusionsanlage benutzt. Die Anlage wird mit Hilfe von zwei Wärmepumpen auf konstant 37°C erwärmt. Um eine mikrobiologische Verunreinigung zu vermeiden, durchspült man die Anlage vor dem Versuch mit 70% Alkohol für mindestens fünf Minuten und anschließend für weitere fünf Minuten mit Aqua destillata. Zur besseren Handhabung der nächsten Schritte ist ein Luer-Lock-Adapter an der Langendorff-Perfusionsanlage montiert. Daran wird ein steriler Filter befestigt, um das Herz vor Bakterien, anderen größeren organischen Strukturen und kleineren Luftblasen zu schützen. Die Anlage wird zur Vorbereitung des Versuches mit einer 37°C warmen Tyrode-Lösung durchspült, die mit 100% Sauerstoff unter einem Fluss von 1l/min mit Sauerstoff gesättigt ist.

Um so wenig wie möglich die Zellen des isolierten Herzens zu gefährden, wird es unmittelbar nach der Entnahme an der Langendorff-Perfusionsanlage mit Hilfe der Stahlkanüle befestigt und zu Beginn für eine Minute mit einem Fluss von 3 ml/min durchspült, um restliches Blut, Stoffwechselprodukte oder freigesetzte Elektrolyte wie Kalzium zu beseitigen. Anschließend ersetzt man die Tyrode-Lösung durch den ebenfalls auf 37°C erwärmten Kollagenasen-Puffer und perfundiert das Herz für weitere 4 bis 5 Minuten. Der optimale Zeitpunkt zur Gewinnung von möglichst vielen vitalen Zellen ist von Herz zu Herz zeitlich variabel. Die besten Ergebnisse lassen sich

## 4. Methoden

durch manuelles Abtasten des Herzens erzielen. Dabei registriert man innerhalb weniger Sekunden eine Konsistenzveränderung des Herzens von elastisch zu schwammig. Ist dieser Zeitraum erreicht, pflückt man das Herz von der Anlage und zerschneidet es mit Hilfe einer Schere in kleinere Fragmente, die in einer Petrischale aufgefangen werden. Unter Zugabe von 2,5 ml Kollagenasen-Puffer werden die Stücke mit einer Plastiktransferpipette, deren Öffnung mit einer Schere auf bis zu 5 mm erweitert wurde, mehrere Male resuspendiert, bis sich die Fragmente größtenteils mazerieren. Vor der weiteren Verarbeitung kontrolliert man mit Hilfe eines Auflichtmikroskops die Güte der Isolation. Zeigen sich hierbei auf einen Blick mehr als 30% lebende bzw. kaum durch die Isolation beeinträchtigte Kardiomyozyten, wird das Experiment fortgesetzt. Als Kriterium für lebendige Zellen fungiert die rod shaped Form (Stab- oder Baumstammform) der Kardiomyozyten. Aufgrund der hohen Vulnerabilität der zu isolierenden Zellen und der geringen Ausbeute an vitalen Zellen versucht man im nächsten Schritt die Konzentration an lebendigen Zellen zu erhöhen. Dazu wird die Zellsuspension durch ein selbstgebautes Sieb aus einem aufgespanntem Seidenstrumpf geträufelt. Das Sieb trennt die Suspension von den noch nicht aufgelösten Herzfragmenten.

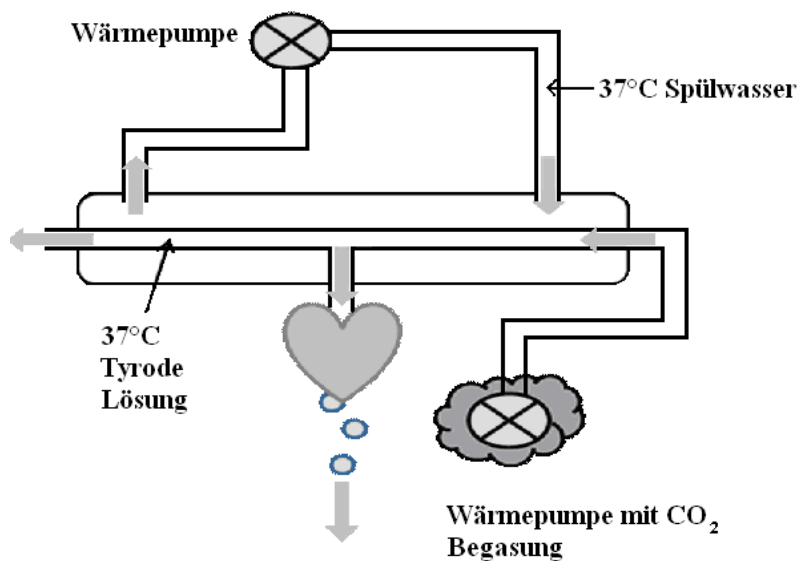


**Abb. 7:** Mäusekardiomyozyte nach der Isolation (vitale (rod shaped) und nicht vitale Zellen)

Um die verbliebende Kollagenasenaktivität im Puffer zu unterbinden, füllt man nun die Suspension in einen 15 ml Polypropylen-Zylinder, der mit 2,5 ml Stop-1-Puffer gefüllt ist, auf ein maximales Volumen von 5 ml. Das darin enthaltene Kalbsserum dient dabei zur Inaktivierung der Kollagenase. Die Zellen inkubieren drei bis fünf Minuten in der Lösung und werden sanft pipettiert. Anschließend wird die Suspension eine Minute bei 180 G zentrifugiert und der Überstand verworfen. Den Bodensatz füllt man mit Stop-2-Puffer auf ein Endvolumen von 10 ml auf und resuspendiert die Zellen in dem Puffer mit einer Pipette.

## 4. Methoden

Ziel des nächsten Arbeitsschrittes ist es, die Kalziumkonzentration des Mediums langsam auf eine Endkonzentration von 1 mM zu erhöhen. Die Zellsuspension wird nun mit Hilfe einer Transferpipette in eine Petrischale umgefüllt. Unter leichtem Schwenken der Petrischale gibt man zunächst 50  $\mu$ l der 10 mM Kalziumchloridlösung dazu. Anschließend inkubieren die Zellen 4 Minuten bei Raumtemperatur. Diesen Schritt wiederholt man noch einmal mit jeweils 50  $\mu$ l und 100  $\mu$ l Kalziumlösung. Die letzten beiden Kalziumzugaben betragen 30  $\mu$ l und 50  $\mu$ l der 100 mM Kalziumlösung. Zuletzt wird die Zellsuspension in einen 15 ml Zylinder umgefüllt und für 30 s bei 180 g zentrifugiert.



**Abb. 8:** Schema der Perfusionsanlage

### 4.1.3 Zellkultur

Der Niederschlag mit den isolierten Kardiomyozyten wird unter einer sterilen Werkbank mit 5ml des vorbereiteten Zellkulturmediums verdünnt und durch vorsichtiges Resuspendieren mit einer Transferpipette darin vermischt. Mit einer Pipette gewinnt man einen Tropfen der Zellsuspension und trägt sie auf einen Objektträger auf, um unter einem Auflichtmikroskop die ungefähre Konzentration der Kardiomyozyten zu bestimmen. Je nach Menge und Vitalität der Zellen tropft man vorsichtig ein bis zwei Tropfen der Suspension auf die mit Laminin beschichteten Zellkulturplatten. Dabei liegt die angestrebte Dichte an Zellen bei ca. 100 vitalen Zellen pro  $\text{cm}^2$ . Unter sanfter Bewegung der Zellkulturplatte lassen sich die Zellen gleichmäßig auf der Fläche verteilen. Anschließend stellt man die beimpften Platten für vier Stunden bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  in den Brutschrank, um den Kardiomyozyten

## 4. Methoden

die Adhäsion und zu erleichtern und ein Equilibriums zu erreichen. Von jedem isolierten Herzen wurden zwölf Zellkulturplatten angelegt. Auf jeder Platte befinden sich im Schnitt ca. 300 Zellen.

### 4.1.4 Anoxie der isolierten adulten Kardiomyozyten

Nach vier Stunden Inkubation tauscht man, um tote oder nicht adhärenente Zellen zu entfernen, mit einer Transferpipette das Zellkulturmedium gegen frisches aus. Danach zählt man zügig innerhalb von ein bis zwei Minuten unter einem Auflichtmikroskop mäanderförmig die Menge der lebende Kardiomyozyten auf der Platte. Anschließend erlaubt man den Zellen, sich für 5 Minuten im Brutschrank zu erholen. Die Lebenden lassen sich morphologisch sehr gut von den Toten unterscheiden. Sie zeigen durch das im Medium enthaltende BDM zwar keine Kontraktion, besitzen aber die typische rod-shaped Form. Tote Zellen hingegen kugeln sich ab und verlieren oft den Kontakt zum Untergrund.

Bei den nun vorbereiteten Platten wird das Zellkulturmedium durch das Anoxiemedium ausgetauscht. Anschließend inkubiert man sie für 20 Minuten bzw. für 40 Minuten in einem anderen Brutschrank, der bei 37°C mit 100% N<sub>2</sub> durchströmt wird. Um eine ausreichende Anoxie innerhalb dieses Zeitraumes zu gewährleisten, kontrolliert man den Sauerstoffgehalt im Medium mit einem Blutgasanalysegerät. Nach 20 Minuten Anoxie lag dieser bei den Versuchen im Schnitt bei maximal 20 mm Hg.

Nach dem Ende des Versuches erfolgt sofort die Auszählung der Zellen mit Hilfe des live / dead kit nach Anweisung des Herstellers. Dabei zeigen lebende Zellen durch Färbung mit Calcein-AM eine grüne Fluoreszenz, tote Zellen durch Ethidinmonodimer-1 Gegenfärbung eine rote Fluoreszenz. So lässt sich in Ruhe mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops und optischen Farbfiltern von **640 nm** für rot und von **530 nm** für grün Tote von lebenden Kardiomyozyten differenzieren.

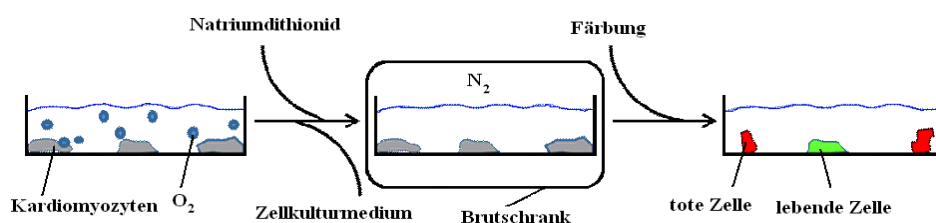


Abb. 9: Schemazeichnung Anoxieversuch



## 5. Ergebnisse

Die Anoxie Versuche werden mit adulten Kardiomyozyten von 15 bis 30 Wochen alten Mäusen durchgeführt. Die aus den deutlich kleineren  $G\alpha_q$ -Knock-out-Mäusen gewonnenen Myozyten zeigen im Laufe der Isolation eine deutlich größere Vulnerabilität. Für diese Gruppe gestaltet es sich schwieriger, eine vergleichbare Menge an lebenden Zellen zu gewinnen.

Pro Versuchsgruppe werden Kardiomyozyten aus jeweils drei (-/-) und drei (+/+) Mäuseherzen gewonnen. Es werden pro Herz zwölf Zellkulturplatten mit Zellen beimpft. Im Schnitt liegt die Anzahl der Zellen pro Platte bei ca. 300.

Gruppe (-/-) n= 3 12 Platten mit ~300 Zellen

Gruppe (+/+) n= 3 12 Platten mit ~300 Zellen

Die angegebenen Ergebnisse werden als arithmetisches Mittel mit der dazugehörigen Standardabweichung dargestellt.

Zu Beginn des Versuches sind unter normoxischen Bedingungen von den Wildtyp Kardiomyozyten (+/+) 97%  $\pm$  1% lebendig. Bei den (-/-) Zellen leben vor der Anoxie noch 86%  $\pm$  4,3%.

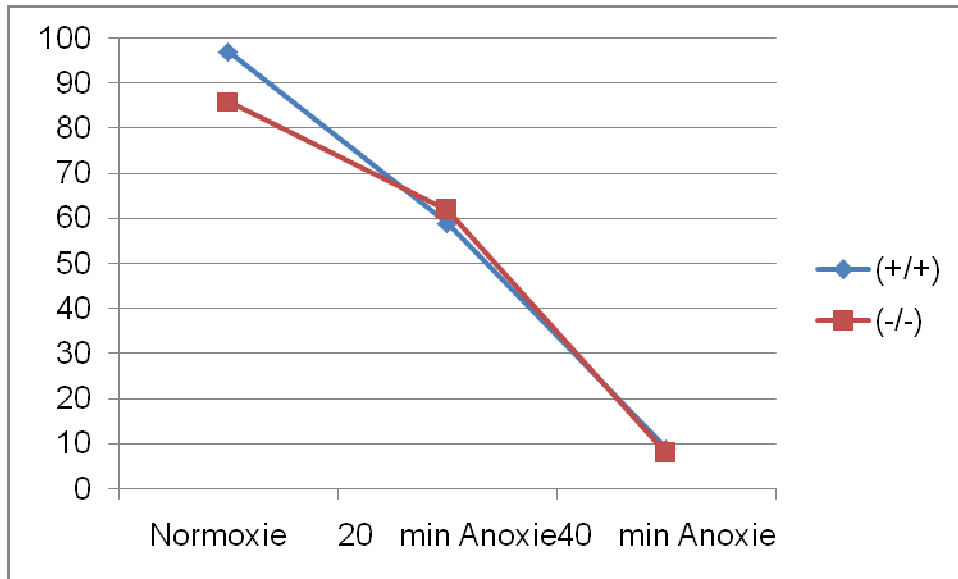
Nach Zugabe des Natriumdithionid und einer anhaltenden Anoxie von 20 Minuten im anoxischen Brutschrank reduziert sich die Anzahl an lebenden Zellen bei (+/+) Kardiomyozyten auf 59%  $\pm$  5,7% und bei den (-/-) Herzzellen auf 62 %  $\pm$  7,9%.

Bei Versuchen mit einer Anoxiezeit von 40 Minuten leben von den (+/+) Zellen nur noch 9%  $\pm$  5, bei den (-/-) Kardiomyozyten waren sogar nur noch 8%  $\pm$  4% lebendig.

	Normoxie	20min Anoxie	40min Anoxie
(+/+) n= 3	97% $\pm$ 1%	59% $\pm$ 5,7%	9% $\pm$ 5
(-/-) n= 3	86% $\pm$ 4,3%	62 % $\pm$ 7,9%.	8% $\pm$ 4%.

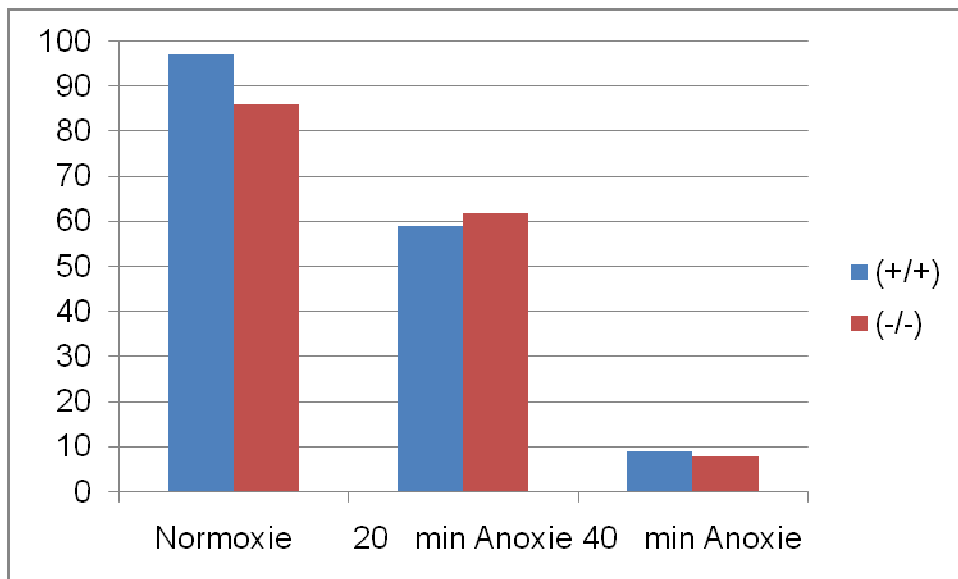
**Abb. 10:** Tabelle der Anoxiedaten (Werte als Mittelwert mit SEM)

## 5. Ergebnisse



**Abb. 11:** Mittelwerte der Überlebensraten zur Dauer der Anoxie

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Anoxie Toleranz zwischen  $G\alpha_q$  exprimierenden und nicht exprimierenden Kardiomyozyten nachweisen lässt.



**Abb. 12:** Mittelwerte der Überlebensraten innerhalb der Gruppen und zur Dauer der Anoxie

### 6. Diskussion

#### 6.1 Zielsetzung

$G\alpha_q$ -Knock-out Mäuse besitzen eine deutlich erhöhte Blutungsneigung, die darauf zurückzuführen ist, dass das für die Aktivierung der Thrombozyten so wichtige  $G\alpha_q$ -Protein nicht exprimiert wird (Offermanns S et al. 1997).

In den vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass  $G\alpha_q$ -Knock-out-Mäuse (-/-) kleinere Infarkte als Wildtypmäuse (+/+) erlitten (Weig HJ et al. 2008). Dabei wurde sowohl bei  $G\alpha_q$ -Knock-out-Mäusen als auch bei Tieren des Wildtyps die LAD (Ramus interventrikulares anterior) für 30 Minuten ligiert und das entstehende Infarktareal nach einer Reperfusionzeit von 24 h vermessen. Die funktionelle Beeinträchtigung des Herzens wurde via Echokardiographie jeweils vor und am Ende des Versuches dokumentiert. Es stellte sich heraus, dass sowohl die Größe des infarzierten Areals als auch die Abnahme des fractional shortening der  $G\alpha_q$ -Herzen geringer war. Beispielsweise betrug die Infarktgröße zur Area at risk, also dem Versorgungsbereich des ligierten Gefäßes, statt 27% beim Wildtyp nur 6% bei  $G\alpha_q$ -Knock-out-Mäuse. Ob nun dieser Effekt auf das Fehlen des  $G\alpha_q$ -Proteins in den Thrombozyten und damit deren Dysfunktion oder auf eine bisher unbekannte Auswirkung des G-Proteins zurückzuführen ist, blieb noch zu klären. Um die Bedeutung der Thrombozyten besser beleuchten zu können, wurde im nächsten Schritt  $G\alpha_q$ -Knock-out-Knochenmark auf vorher Knochenmarks-ablativ bestrahlte Wildtypmäuse transplantiert und vice versa (Weig HJ et al. 2008). In der anschließend durchgeführten kardialen Ischämie und Reperfusion-Untersuchung ließ sich nachweisen, dass die chimären Wildtypiere mit den  $G\alpha_q$ -Knock-out-Thrombozyten ebenfalls kleinere Infarkte entwickelten. Der Unterschied für die Infarktgröße zur Area at risk betrug hierbei 8% bei (-/-) Knochenmark versus 18% mit (+/+) Knochenmark (Weig HJ et al. 2008).

Das Ziel dieser Arbeit war es, zu klären, ob die etwas geringere Infarktgrößenreduktion bei den chimären Wildtyp-Mäusen darauf beruht, dass (-/-)  $G\alpha_q$ -Kardiomyozyten eine bessere Ischämie-(Anoxie)-Toleranz haben als Wildtyp-Kardiomyozyten.

### 6.2 Versuchsdurchführung

Um eine möglichst gutes Ergebnis mit vielen vitalen Kardiomyozyten zu erzielen, orientierte sich die Isolationsmethode an bereits an anderer Stelle beschriebenen Methoden (Kruppenbacher JP et al. 1993, Zhou YY et al. 2000). Es erwies sich aber als problematisch ein Protokoll zu erarbeiten, dass auf die Mäuse Kardiomyozyten Isolation zugeschnitten war. Der Großteil der veröffentlichten Protokolle zur Kardiomyozytenisolation ist entweder auf andere Spezies zugeschnitten oder ist nicht für die Isolation von Zellen für eine Zellkultur geeignet. Nach mehreren Modifikationen der vorhandenen Protokolle erbrachten die ersten Isolationen maximal 20% vitale Zellen oder eine so geringe Ausbeute, dass eine Kultur nicht sinnvoll war. Der Isolationsansatz mit Hilfe einer Langendorf Perfusion lieferte in den ausgewerteten Versuchen ca. 40% bis 60% rod shaped Kardiomyozyten. Diese Menge deutet auf eine insgesamt gute Qualität und Standardisierung der Isolation hin. Andere Autoren berichten ebenfalls von einer Ausbeute von ca. 50% (Zhou YY et al. 2000). Die hohe Ausbeute war insbesondere durch die Zugabe von 2,3-Butanedionemonoxide (BDM) möglich. BDM ist eine Chemikalie, die den Kontraktionsschaden im Zuge der Reoxygenierung reduzieren kann, da sie die Myofibrillen blockiert und reversibel den Kontraktionsmechanismus der Myozyten unterbindet. Dabei geht von dem Medikament selbst keine Toxizität aus (Wolska BM et al. 1996, Piper HM et al. 1998).

Bei der Abschätzung der Perfusionszeit mit der Kollagenasen-Lösung gestaltete sich die Standardisierung problematisch. Diese variierte pro Herz zwischen vier und sieben Minuten. Bereits bei Abweichungen von lediglich einer Minute waren entweder die Gesamtzellausbeute gering oder nur noch wenige vitale Zellen erhalten. Die besten Ergebnisse zur Abschätzung des richtigen Zeitraumes erzielte die Palpation des Herzens. Das Gewebe änderte passend zum optimalen Perfusionsende seine Konsistenz und wurde schwammig. Ein weiterer Schritt zur Optimierung der Überlebensrate war die schrittweise Erhöhung der Kalziumkonzentration. Durch diese Modifikationen konnte die Anzahl an vitalen Kardiomyozyten durch Zentrifugation am Ende der Isolation auf 80% erhöht werden. Doch trotz der Möglichkeit, den Gesamtertrag zu erhöhen, scheint die initiale Qualität der Isolation von besonderer Bedeutung zu sein. War die Anzahl der lebenden Zellen in der ersten Kontrolle sehr gering, überlebte auch nur ein geringer Anteil der Zellen die ersten vier Stunden der Isolation. Der entstandene Schaden bei den auf den

## 6. Diskussion

ersten Blick gesunden Kardiomyozyten aus Isolationen mit geringer Ausbeute scheint größer zu sein, als bei Isolationen mit besserer Ergebnissen (Verdouw PD 1998).

Bei der Gewinnung von Kardiomyozyten aus den deutlich kleineren (-/-)  $G\alpha_q$ -Herzen erhielt man im Vergleich zum Wildtyp weniger lebendige Zellen. Dieses Missverhältnis ließ sich durch kürzere Perfusionszeiten der Knock-out-Herzen verbessern. Inwieweit diese höhere Empfindlichkeit zu erklären ist oder ob eine ausgeprägtere frühere Schädigung die Ergebnisse beeinflusste, lässt sich nicht abschätzen.

Die besondere Schwierigkeit einer Zellkultur mit primär gewonnenen Kardiomyozyten wurde bereits durch Zhou beschrieben. Insbesondere die hohe Sterblichkeit stellt ein schwer zu lösendes Problem da (Zhou YY et al. 2000). Bei den ersten Versuchen wurde den Zellen nach der Isolation zwölf Stunden Ruhe eingeräumt, um ein Equilibrium zu erreichen. Dieses Vorgehen wurde aber schnell verworfen, da nur wenige Kardiomyozyten diese Zeitspanne überlebten. Nach mehreren Versuchen erwies sich vier Stunden Ruhe als optimal. Innerhalb dieser kurzen Zeit gab es kaum Verluste und ein Großteil der Myozyten war bereits auf der Laminin beschichteten Oberfläche adherent. Auch andere Autor empfehlen diese kurze Phasen (Mitcheson JS et al. 1998). Kruppenbacher berichtet sogar von lediglich zwei bis drei Stunden, in denen es zu einer festen Verbindung der Zellen mit dem Untergrund kommt und es zu einer Reparatur des durch die Isolation gesetzten Schadens kommen kann (Kruppenbacher D 1993).

Nach der Etablierung der Zellen in der Zellkultur zeigte sich, dass eine Anoxiedauer von lediglich 20 Minuten auswertbare Ergebnisse brachte. Oberhalb dieser Zeitgrenze kam es zu einem massiven Absterben der Zellen. Nach 40 Minuten lebten lediglich noch ca. 5% der Myozyten. Die kurze Ischämiezeit lässt sich aber gut mit den in den vivo Voruntersuchungen erreichten Zeiten vergleichen. Diese erstreckten sich ebenfalls nur auf 30 Minuten Ischämie Zeit und somit müsste sich der Effekt der besseren Ischämietoleranz auch in vitro zeigen.

Zur Sicherstellung einer ausreichenden Anoxie im Medium wurde zusätzlich Stickstoff begasung ( $N_2$ ) das Reduktionsmittel Natriumdithionit in die Anoxielösung gegeben. Natriumdithionit ( $Na_2S_2O_4$ ) reagiert mit Sauerstoff ( $O_2$ ) zu Natriumsulfit ( $Na_2SO_3$ ) und Natriumsulfat ( $Na_2SO_4$ ). In den Vorversuchen zeigte sich, dass eine alleinige Stickstoffbegasung auf Dauer kein sauerstoffreies Medium erzeugen konnte. Natriumdithionit wurde bereits in mehreren Studien zum Setzen eines

## 6. Diskussion

anoxischen Reizes benutzt (Carpenter E et al. 2000; Mochizuki S et al. 1997; Seki S et al. 1995). Aufgrund der begrenzten Stabilität der Verbindung und damit der unterschiedlichen Sauerstoffbindungskapazität wurde am Ende jedes Versuches der Sauerstoffgehalt im Medium durch ein Blutgasanalysator bestimmt. Der Sauerstoffgehalt überschritt nach 20 Minuten Anoxie nie 20 mmHg.

Inwiefern die Anoxie in der Zellkultur den Auswirkungen des Sauerstoffentzuges im in vivo Modell gerecht wird, lässt sich nur mutmaßen, da ja gerade die Isolation der Zellen die ausschließliche Betrachtung der Kardiomyozyten ohne störende Einflüsse von anderen Zellen ermöglichen sollte. Die Isolation bietet auf der einen Seite die Möglichkeit, eine homogene Population unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen. Auf der anderen Seite spiegeln die Zerstörung des Zellverbandes und die Kultur in zweidimensionalen Schalen nicht die komplexen interzellulären Wechselwirkungen der Kardiomyozyten wider. Diese kann zu einer veränderten Proteinexpression oder zu einem Rearrangement des Zytoskeletts führen. Möglicherweise reagieren die veränderten Zellen anders auf die induzierte Anoxie. Durch den Verlust des Zellverbandes und den Entzug von Mediatoren in der Zellkultur könnte es zu einer Downregulation von Rezeptoren auf der Oberfläche der Myocyten kommen. So dass dadurch in den in vitro Anoxieversuchen Zellen mit anderen Oberflächenrezeptoren und somit auch anderen Reaktionen auf Stimuli als in den in vivo Experimenten aufzufinden waren. Gegen diese Vermutung spricht jedoch, dass in einer Untersuchung der G-Proteine  $G\alpha_s$  und  $G\alpha_i$  noch nach einem Tag in der Zellkultur die gleiche Anzahl wie in einem intakten Zellverband vorgefunden wurden (Zhou YY et al. 2000).

### 6.3 Ergebnisse

In dieser Studie untersuchten wir die unterschiedliche Anoxietoleranz von  $G\alpha_q$  Kardiomyozyten aus Knock-out-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachweisen. Somit stellt sich die Frage wie dieses Ergebnisse in Zusammenhang mit den Voruntersuchungen (Weig HJ et al. 2008) zu bewerten ist. Auffällig bei diesen Ergebnissen war, dass Wildtypmäuse mit transplantiertem  $G\alpha_q$ -Knock-out-Knochenmark zwar kleinere Infarkte als Wildtypmäuse ausbildeten, aber nicht annähernd eine Infarktreduktion wie bei Knock-out-Mäusen messbar war. In Zusammenschau mit den eigenen Ergebnissen lässt sich dies folgendermaßen erklären. Das  $G\alpha_q$ -Protein wird

## 6. Diskussion

zusammen mit seinem strukturellen und funktionellen Analogon dem  $G\alpha_{11}$ -Protein auf nahezu allen Säugetierzellen ausgebildet. Thrombozyten bilden hier allerdings eine Ausnahme, da sie ausschließlich  $G\alpha_q$ -Protein exprimieren (Wilkie T et al. 1991; Wettschureck N et al. 2005). Demzufolge sind Thrombozyten die einzigen Zellen, die von einem vollständigen Fehlen des  $G\alpha_q$ -Protein betroffen sind. Der protektive Effekt des fehlenden  $G\alpha_q$ -Proteins erklärt sich also vorwiegend durch eine rein thrombozytäre Wirkung. Die Messergebnisse ließen sich durch einen hohen Chimärismus der transplantierten Tiere von ca. 90% erklären, so dass die verbliebenen Wildtypthrombozyten das schlechtere Abscheiden verursachen könnten. Eine weitere mögliche Erklärung für eine bessere Ischämietoleranz der (-/-) Kardiomyozyten in den in vivo Versuchen liegt in der Kopplung des  $G\alpha_q$ -Proteins an den Apoptose induzierenden Signalweg. So findet man bei Mäusen mit einer vierfachen Erhöhung der  $G\alpha_q$ -Expression im Herzen eine starke myokardiale Hypertrophy (D'Angelo et al. 1997). Wird die Expression noch weiter erhöht, kommt es im Zuge dieses Reizes zu einer verstärkten Apoptose (Adams et al. 1998). In neonatalen Ratten Myozyten führt eine konstitutiv aktive Form des  $G\alpha_q$ -Proteins zusammen mit einer Stimulation der ihm nachgeschalteten PLC- $\beta$  umgehend zur Apoptose (Kajstura J et al. 1997). Eine Aktivierung des  $G\alpha_q$ -Protein stimuliert die PLC- $\beta$  (Wenham D et al. 1997), die über DAG die PKC aktiviert (Kajstura J et al. 1997, Cigola E et al. 1997). Die PKC besitzt eine zentrale Rolle im Ischämie- und Reperusionsmodell. Im Rahmen von Studien, bei denen nach einer gesetzten Ischämie oder Reperfusion ihre Aktivität pharmakologisch reduzierte, konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl die Anzahl an untergehenden Myozyten als auch die Apoptoserate der betroffenen Zellen reduziert werden (Martin JL et al. 2001, Tanaka Y et al. 2003). Im weiteren Verlauf erreicht das Signal die Familie der MAP-Kinasen (McWhinney C et al. 2000; Singh et al. 2001; Sugden PH et al. 1998): Ein Vertreter dieser Gruppe ist die JNKs (c-Jun-terminale Kinase). Ihre Wirkung ist noch ungeklärt, da sie sowohl pro als auch kontra apoptotisch wirken kann. Bei der p38 Kinase verhält es sich ähnlich. Sie kann wie die JNKs der Apoptose zuarbeiten oder sie verhindern. Bei beiden Proteinen sind die Auswirkungen aber sehr stark Spezies abhängig. So ließ sich nachweisen, dass durch Hypoxie oder Agonisten wie Angiotensin II und Norepinephrin über eine p38 Aktivierung direkt die Apoptose ausgelöst wird (Singh et al. 2001; Sharov VG 2003). Eine weitere Gruppe der MAP-Kinasen sind die ERKs (Extracellular response kinase), sie hemmen die Apoptose

## 6. Diskussion

und können unter anderem über das  $G\alpha_q$ -Protein angesteuert werden (Xiao L et al. 2001).

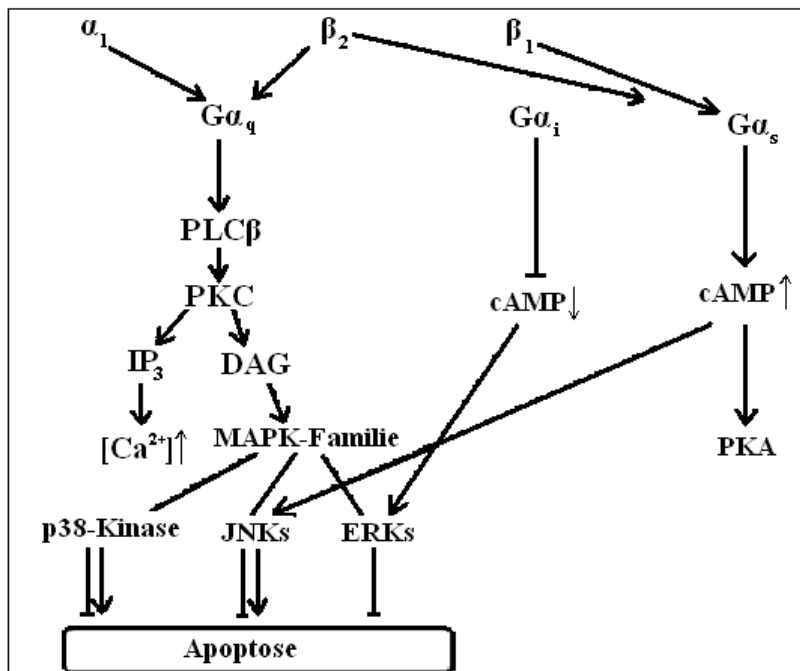


Abb. 13: Schlüsselrolle der PKC

Das  $G\alpha_q$ -Protein scheint aber auch auf anderen Wegen den Zellzyklus zu beeinflussen. Untersuchungen konnten zeigen, dass sie die antiapoptotische Akt-Kinase inhibiert (Tanaka Y et al. 2003, Howes AL et al. 2003).

Ein weiterer Hinweis für die Bedeutung des  $G\alpha_q$ -Signalweges im Ischämie-/Reperfusionsgeschehen zeigt sich darin, dass man in den Randzonen von infarzierten Arealen eine deutliche Überexpression von  $G\alpha_q$ -Proteinen findet (Ju H et al. 1998). In einer Region des Herzens, in der es im Laufe des Remodeling sowohl zum Absterben als auch zu einer Erholung des Gewebes kommen kann.

Kardiomyozyten besitzen neben dem  $G\alpha_q$ -Protein auch das  $G\alpha_{11}$ -Protein (Jantzen HM et al. 2001; Milligan G et al. 1993). Sowohl  $G\alpha_q$  als auch  $G\alpha_{11}$  werden durch gleiche Rezeptoren angesteuert und regulieren die  $PLC\beta$  (Wange RL et al. 1991; Offermanns S et al. 1994; Rhee SG 2001). Im Gegensatz zu Kardiomyozyten konnte auf Thrombozyten kein  $G\alpha_{11}$  nachgewiesen werden und so liegt die Vermutung nahe, dass in den  $G\alpha_q$ -Knock-out-Herzen zwar  $G\alpha_q$  fehlt, dieser Mangel aber durch das  $G\alpha_{11}$ -Protein ausgeglichen wird.



## 6. Diskussion

In der Zellkultur liegt eine weitgehend homogene Kardiomyozytenkultur vor. Fibrozyten, Immunzellen und Endothel fehlen oder besitzen nicht mehr ihre räumliche Orientierung zueinander. Somit könnte der fehlende Kontakt der Stromazellen oder des Endothels mit den Myozyten zu einer veränderten Signalkaskade führen.

Ob die Zellen in den in vivo Versuchen letztlich im Rahmen der Ischämie, also bedingt durch z.B. die Anoxie, oder durch den Reoxygenierungsschaden zugrunde gingen, ist nicht nachzuvollziehen. Doch gerade dieser Reperfusionsschaden ist für bis zu 50 % der Größe des infarzierten Gewebes verantwortlich (Yellon DM 2007).

Die isolierten Bedingungen der Myozyten ohne zirkulierende Mediatoren kann ebenfalls zu einer Maskierung des Anoxieeffektes führen. So könnten im Rahmen der in vivo Experimente freigesetzte Katecholamine die Apoptose induzieren. Hohe Konzentrationen des über G-Proteine wie zum Beispiel  $G\alpha_q$  koppelnden Angiotensin II führen zur Apoptose (Kajustra J et al. 1997, Cigola E et al. 1997). Im Zuge der 24 stündigen Reperfusion des in vivo Modells hätten die Zellen genug Zeit, um entsprechende Signalwege zu aktivieren. Gleichzeitig stellt sich die Frage, ob eine anschließende längere Reoxygenierung den Zellen der Zellkultur genug Zeit gegeben hätte, nach dem anoxischen Reiz ebenfalls in Apoptose zu gehen. Die hohen Verluste an Kardiomyozyten bereits unter Ruhebedingungen machte aber ein solches Vorgehen nicht praktikabel. Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass die unterschiedliche Infarktgröße bei den vorherigen Transplantationsversuchen durch den Chimärismus des Knochenmarkes der Tiere zu erklären wäre. Diese Arbeit schließt eine größere Anoxietoleranz der  $G\alpha_q$ -Knock-out-Kardiomyozyten auf die Infarktgröße weitgehend aus, da sie keine unterschiedliche Anoxietoleranz zwischen den Gruppen nachweisen konnte.

### 7. Zusammenfassung

In der Pathophysiologie des akuten Myokardinfarktes spielen die Thrombozyten eine entscheidende Rolle. Durch ihre Aktivierung kommt es zum thrombotischen Verschluss der Koronarien und durch die von ihnen freigesetzten Entzündungsmediatoren fördern sie die Entstehung des Reperfusionsschadens.

Für die Aktivierung der Thrombozyten und deren adäquater Funktion ist das G-Protein  $G\alpha_q$  von besonderer Bedeutung.  $G\alpha_q$  ist in nahezu allen Säugetierzellen zusammen mit seinem strukturellen und funktionellen Analogon dem  $G\alpha_{11}$  zu finden. Eine Ausnahme bilden die Thrombozyten, da diese ausschließlich  $G\alpha_q$  exprimieren. Somit sind sie nahezu die einzigen Zellen, die von einem entsprechenden G-Proteinmangel betroffen sind. In den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass  $G\alpha_q$ -Knock-out-Mäuse signifikant kleinere Herzinfarkte ausbilden. Um auszuschließen, dass andere Zellen einen Effekt auf die Größe der entstehenden Infarkte haben könnten, wurde Wildtypmäusen  $G\alpha_q$ -Knock-out-Knochenmark transplantiert. Diese Mäuse erlitten zwar kleinere Infarkte als die Vergleichsgruppe, doch wider Erwarten größere Defekte als die  $G\alpha_q$ -Knock-out-Mäuse. Diese Beobachtung bildet die Grundlage für die vorliegende Arbeit. Ihre Aufgabe ist es die Vulnerabilität von  $G\alpha_q$ -Knock-out-Kardiomyozyten gegenüber einem anoxischen Reiz ohne die störende Effekte von Thrombozyten oder anderen Zellen zu untersuchen. Dazu wurden zunächst primäre  $G\alpha_q$ -Knock-out- und Wildtyp-Kardiomyozyten gewonnen und in Zellkultur gebracht. Nachdem sich ein gewisses Equilibrium eingestellt hatte, wurden die isolierten Zellen einer Anoxie von 20 Minuten ausgesetzt. Zur Simulierung der anschließenden Reperfusion inkubierten die Zellen danach für zwei Stunden unter normoxischen Bedingungen. Die Auswertung des anoxischen Reizes erfolgte durch unterschiedliche Färbung der toten bzw. lebendigen Zellen.

Nach Abschluss der Versuche konnte kein signifikanter Unterschied in der Anoxietoleranz zwischen Wildtyp ( $59\pm 6\%$ ) und  $G\alpha_q$ -Knock-out-Kardiomyozyten ( $62\pm 8\%$ ) festgestellt werden.

Somit ist die Reduktion der Infarktgröße bei  $G\alpha_q$ -Knock-out-Mäusen wahrscheinlich ein größtenteils thrombozytärer Effekt. Die etwas größer ausfallenden Infarkte bei den transplantierten Tieren erklären sich am ehesten als ein Ergebnis der inkompletten Chimärisierung von ca. 90% und somit residualen Wildtypthrombozyten.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

(+/-) bzw. (-/-)	Wildtyp $G\alpha_q$ -Protein bzw. kein exprimiertes $G\alpha_q$ -Protein
A.	Arterie
ADP	Adenosindiphosphat
AV-Knoten	Atrioventrikularknoten
ATP	Adenosintriphosphat
BCS	Bovines Kälber Serum
BDM	2,3-Butanedionemonoxide
bp	Basenpaare
$Ca^{2+}$	Kalzium
Caspasen	Cysteiny aspartate cleaving proteases
CRP	C-reaktive Protein
cGMP	Guanosinmonophosphat
DAG	Diacylglycerin
ERK	Extracellular Response Kinase
KHK	Koronare Herzkrankheit
Gp	Glykoprotein
$H^+$	Proton
$IP_3$	Inositoltrisphosphat
JNKs	c-Jun-terminale Kinase
$K^+$	Kalium
LAD	Ramus interventrikulares anterior
LDL	Low density lipoprotein
LCX	Ramus circumflexus
MAP-Kinasen	Mitogen aktivierte Protein-Kinasen
Mo LDL	minimal oxidiertes LDL
MMP	Matrix Metalloproteinasen
$Na^+$	Natrium
NAD/NADH <sub>2</sub>	Nicotinamid Adenin Dinucleotid
NO	Stickstoffmonoxid
PCI	Perkutane koronare Intervention
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

## 8. Abkürzungsverzeichnis

PDGF	Platelet derived growth factor
PDTF	Platelet derived transforming factor
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKA	Protein Kinase-A
PLC- $\beta$	Phospholipase-C- $\beta$
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-bisphosphat
R.	Ramus
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
RGS	Regulator of G-Protein signaling
SEM	Standard Error of the Mean
SMC	Smooth muscle cell
TGF- $\beta$	Transforming growth factor- $\beta$
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
vWF	von Willebrand Faktor

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Übersicht der Elektrolytverschiebungen einer Zelle als Folge eines reduzierten Sauerstoffangebots mit Betonung der zentralen Rolle des Natriumions	S. 10
Abb. 2: G-Protein Zyklus	S. 26
Abb. 3: Kopplung der $G\alpha_{i/o}$ -Proteine	S. 27
Abb. 4: Kopplung des $G\alpha_s$ -Protein	S. 27
Abb. 5: Kopplung der $G\alpha_q/11$ -Proteine	S. 29
Abb. 6: G-Protein gekoppelte Rezeptoren: Regulation des Kardiomyozyten Wachstum nach Adams JW et al 2001	S. 32
Abb. 7: Isolierte native Mäuse Kardiomyozyten	S. 43
Abb. 8: Schema der Perfusionsanlage	S. 44
Abb. 9: Schemazeichnung Anoxieversuch	S. 45
Abb. 10: Tabelle der Anoxiedaten	S. 46
Abb. 11: Mittelwerte der Überlebensraten zur Dauer der Anoxie	S. 47
Abb. 12: Mittelwerte der Überlebensraten innerhalb der Gruppen und zur Dauer der Anoxie	S. 47
Abb. 13: Schlüsselrolle der PKC	S. 53

## 10. Literaturverzeichnis

Adams JW, Brown JH (2001)

G-proteins in growth and apoptosis: lessons from the heart  
Oncogene; 20: 1626-1634

Adams JW, Sakata Y, Davis MG, Sah VP, Wang Y, Liggett SB, Chien KR, Brown JH, Dorn GW (1998)

Enhanced  $G_{\alpha_q}$  signaling: A common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure

Proc Natl Acad Sci USA; 95: 10140-10145

Ahn D, Cheng L, Moon C, Spurgeon H, Lakatta EG, and Talan MI (2004)

Induction of myocardial infarcts of a predictable size and location by branch pattern probability-assisted coronary ligation in C57BL/6 mice

Am J Physiol Heart Circ Physiol; 286: H1201–H1207

Agah R, Kirshenbaum LA, Abdellatif M, Truong LD, Chakraborty S, Michael LH, Schneider MD (1997)

Adenoviral delivery of E2F-1 directs cell cycle reentry and p53-independent apoptosis in postmitotic adult myocardium in vivo.

J Clin Invest; 100: 2722-2728

Akhter SA, Luttrell LM, Rockman HA, Iaccarino G, Lefkowitz RJ, Koch WJ (1998)

Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy.

Science ; 280: 574-577

Asai K, Yang GP, Geng YJ, Takagi G, Bishop S, Ishikawa Y, Shannon RP, Wagner TE, Vatner DE, Homcy CJ, Vatner SF (1999)

$\beta$ -Adrenergic receptor blockade arrests myocyte damage and preserves cardiac function in the transgenic  $G_{s\alpha}$  mouse

J. Clin. Invest; 104: 551–558

Baker GR, Sullam PM, Levin P (1997)

A Simple, Fluorescent Method to Internally Label Platelets Suitable for Physiological Measurements

American Journal of Hematology; 56: 17–25

Barbee RW, Perry BD, Ré RN, Murgo JP (1992)

Microsphere and dilution techniques for the determination of blood flows and volumes in conscious mice.

Am J Physiol; 263: R728-33

Barth E, Stämmler G, Speiser B, Schaper J (1992)

Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man.

J Mol Cell Cardiol; 24: 669-81

Bers DM (2002)

Cardiac excitation-contraction coupling.

Nature; 415: 198-205

## 10. Literaturverzeichnis

- Berstein G, Blank JL, Jhon DY, Exton JH, Rhee SG, Ross EM (1992)  
Phospholipase C- $\beta$ 1 is a GTPase-activating protein for G<sub>q/11</sub>, its physiologic regulator  
Cell; 70: 411-418
- Behnke O, Forer A (1998)  
From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream.  
Eur J Haematol Suppl; 61: 3-23
- Bhatt DL, Topol EJ (2003)  
Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy.  
Nat Rev Drug Discov; 2: 15-28
- Bialik S, Geenen DL, Sasson IE, Cheng R, Horner JW, Evans SM, Lord EM, Koch CJ, Kitsis RN (1997)  
Myocyte Apoptosis During Acute Myocardial Infarction in the Mouse Localizes to Hypoxic Regions but Occurs Independently of p53  
J. Clin. Invest.; 100: 1363–1372
- Bisognano JD, Weinberger HD, Bohlmeier TJ, Pende A, Reynolds MV, Sastravaha A, Roden R, Asano K, Blaxall BC, Wu SC, Communal C, Singh K, Colucci W, Bristow MR, Port DJ (2000)  
Myocardial-Directed Overexpression of the Human  $\beta$ <sub>1</sub>-Adrenergic Receptor in Transgenic Mice  
Journal of Molecular and Cellular Cardiology; 32: 817-830
- Bolli R, Marbań E (1999)  
Molecular and Cellular Mechanisms of Myocardial Stunning  
Physiol Rev; 79: 609-634
- Brass LF, Vassallo RR Jr, Belmonte E, Ahuja M, Cichowski K, Hoxie JA (1992)  
Structure and Function of the Human Platelet Thrombin Receptor  
J Biol Chem; 267: 13795-13798
- Brass LF, Zhu L, Stalker TJ (2005)  
Minding the gaps to promote thrombus growth and stability.  
J Clin Invest; 115: 3385-92
- Bluestein D, Niu L, Schoephoerster RT, Dewanjee MK (1997)  
Fluid mechanics of arterial stenosis: relationship to the development of mural thrombus.  
Ann Biomed Eng; 25(2): 344-56
- Bültmann BD, Kirkpatrick CJ, Baba HA (2004)  
Kardiovaskuläre System  
In „Pathologie“  
Böcker W, Denk H, Heinz PU (Hrsg.)  
Urban und Fischer Verlag, München-Jena; 2004, 3.Auflage: 441-469
- Cai H, Harrison DG (2000)  
Endothel Dysfunction in cardiovascular Disease  
Circ Res; 87: 840-844
- Chandler AB, Hand RA (1961)  
Phagocytized Platelets: A Source of Lipids in Human Thrombi and Atherosclerotic Plaques  
Science; 134: 946-947

## 10. Literaturverzeichnis

- Carpenter E, Hatton CJ, Peers C (2000)  
Effects of hypoxia and dithionite on catecholamine release from isolated type I cells of the rat carotid body  
Journal of Physiology; 523.3: 719—729
- Cigola E, Kajstura J, Li B, Meggs LG, Anversa P(1997)  
Angiotensin II activates programmed myocyte cell death in vitro.  
Exp Cell Res; 231: 363-71
- Communal C, Singh K, Pimentel DR, Colucci WS (1998)  
Norepinephrine Stimulates Apoptosis in Adult Rat Ventricular Myocytes by Activation of the  $\beta$ -Adrenergic Pathway  
Circulation; 98: 1329-1334
- Cordeiro JM, Howlett SE, Ferrier GR (1994)  
Simulated ischaemia and reperfusion in isolated guinea pig ventricular myocytes.  
Cardiovasc Res; 28: 1794-802
- Crow MT, Mani K, Nam YJ, Kitsis RN (2004)  
The Mitochondrial Death Pathway and Cardiac Myocyte Apoptosis  
Circ Res; 95: 957-970
- Coughlin SR (2005)  
Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology.  
J Thromb Haemost; 3: 1800-14
- D'Angelo DD, Sakato Y, Lorenz JN, Boivin GP, Walsh RA, Liggett SB, Dorn GW (1997)  
Transgenic G $\alpha$ q overexpression induces cardiac contractile failure in mice  
Medical Sciences; 94: 8121–8126
- Daub K, Lindemann S, Langer H, Seizer P, Stellos K, Siegel-Axel D, Gawaz M (2007)  
The evil in atherosclerosis: Adherent platelets induce foam cell formation  
Seminars in thrombosis and hemostasis; 33: 173-178
- Davì G, Patrono C (2007)  
Platelet Activation and Atherothrombosis  
N Engl J Med; 357: 2482-94
- Davies MJ, Thomas A (1984)  
Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death  
N Engl J Med; 310: 1137-1140
- Davignon J, Ganz P (2004)  
Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis  
Circulation; 109: III-27–III-32
- Demer LL, Watson KE, Boström K (1994)  
Mechanism of Calcification in Atherosclerosis  
Trends Cardiovasc Med; 4: 45-49
- Doevendans PA, Daemen MJ Muinck de ED, Smits JF (1998)  
Cardiovascular phenotyping in mice  
Cardiovascular Research; 39: 34-49



## 10. Literaturverzeichnis

- Donoso P , Mill JG O'Neill SC, Eisner DA (1992)  
Fluorescence Measurement of Cytoplasmatic and Mitochondrial Sodium Concentration in rat Ventricular myocytes  
Journal of Physiology; 448, 493-509
- Dopheide SM, Maxwell MJ, Jackson SP(2002)  
Shear-dependent tether formation during platelet translocation on von Willebrand factor.  
Blood; 99: 159-67
- Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ (1999)  
Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice.  
Proc Natl Acad Sci U S A; 96: 7059-64
- Exton JH (1996)  
Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins.  
Annu Rev Pharmacol Toxicol; 36: 481-509
- Falk E, Shah PK, Fuster V (1995)  
Coronary Plaque Disruption  
Circulation; 92: 657-671
- Falk E (1983)  
Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating coronary thrombosis  
Br Heart J; 50: 127-34
- Falk E (1985)  
Unstable angina with fatal outcome: dynamic coronary thrombosis leading to infarction and/or sudden death  
Circulation; 71(4): 699-708
- Faraday N, Scharpf RB, Dodd-o JM, Martinez EA, Rosenfeld, Dorman T (2001)  
Leukocytes Can Enhance Platelet-mediated Aggregation and Thromboxane Release via Interaction of P-selectin Glycoprotein Ligand 1 with P-selectin  
Anesthesiology; 94: 145–51
- Farber JL, Chien KR, Mitnacht S (1981)  
The Pathogenesis of Irreversible Cell Injury in Ischemia  
Am J Pathol; 102: 271-281
- Fichtlscherer S, Rosenberger G, Walter DH, Breuer S, Dimmeler S, Zeiher AM (2000)  
Elevated C-Reactive Protein Levels and Impaired Endothelial Vasoreactivity in Patients With Coronary Artery Disease  
Circulation; 102: 1000-1006
- Freedman JE, Loscalzo J, Barnard MR, Alpert C, Keaney JF, Michelson AD (1997)  
Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment.  
J Clin Invest; 100 :350-356
- Fuster V (1994)  
Lewis A. Conner Memorial Lecture: Mechanisms Leading to Myocardial Infarction: Insights From Studies of Vascular Biology  
Circulation; 90: 2129-2146

## 10. Literaturverzeichnis

- Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH (1992)  
The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2).  
N Engl J Med; 326: 310-8
- Gachet C, Hechler B, Léon C, Vial C, Leray C, Ohlmann P, Cazenave JP (1997)  
Activation of ADP receptors and platelet function.  
Thromb Haemost; 78: 271-5
- Ganote CE (1985)  
Cell to cell interactions contributing to the "oxygen paradox".  
Basic Res Cardiol; 80(2): 141-6
- Gawaz M (2004)  
Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium  
Cardiovascular Research; 61: 498–511
- Gawaz M, Langer H, May AE (2005)  
Platelets in inflammation and atherogenesis  
J Clin Invest; 115: 3378–3384
- Gehrmann J, Meister M, Maguire CT, Martins DC, Hammer PE, Neer EJ, Berul CI, Mende U (2002)  
Impaired parasympathetic heart rate control in mice with a reduction of functional G protein betagamma-subunits.  
Am J Physiol Heart Circ Physiol; 282: H445-56
- George JN (2000)  
Platelets  
Lancet; 355: 1531–39
- Gu JL, Müller S, Mancino V, Offermanns S, Simon MI (2002)  
Interaction of  $G\alpha_{12}$  with  $G\alpha_{13}$  and  $G\alpha_q$  signaling pathways  
PNAS; 99: 9352-9357
- Gurney AL, Carver-Moore K, de Sauvage FJ, Moore MW (1994)  
Thrombocytopenia in c-mpl-Deficient Mice  
Science; 265: 1445-1447
- Hansson GK (2005)  
Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease  
N Engl J Med; 352: 1685-95.
- Hasking GJ, Esler MD, Jennings GL, Burton D, Johns JA, Korner PI (1986)  
Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity.  
Circulation; 73: 615-21
- Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T (2002)  
Platelet activation and blood coagulation.  
Thromb Haemost; 88: 186-93
- Hepler JR, Gilman AG (1992)  
G proteins

## 10. Literaturverzeichnis

Trends Biochem Sci; 17: 383-7

Hoak JC (1988)

Platelets and atherosclerosis.

Semin Thromb Hemost; 14: 202-5

Hollinger Susanne, Hepler JR (2002)

Cellular Regulation of RGS Proteins: Modulators and Integrators of G protein Signaling

Pharmacological Reviews; 54: 527-559

Holly TA, Drincic A, Byun Y, Nakamura S, Harris K, Klocke FJ, Cryns VL (1999)

Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo.

J Mol Cell Cardiol; 31: 1709-15

Howes AL, Arthur JF, Zhang T, Miyamoto S, Adams JW, Dorn GW, Woodcock EA, Brown JH (2003)

Akt-mediated Cardiomyocyte Survival Pathways Are Compromised by G<sub>αq</sub>-induced Phosphoinositide 4,5-Bisphosphate Depletion

The Journal of Biological Chemistry; 278: 40343–40351

Huang JQ, Radinovic S, Rezaiefar P, Black SC (2000)

In vivo myocardial infarct size reduction by a caspase inhibitor administered after the onset of ischemia

European Journal of Pharmacology; 402: 139–142

Iwase M, Bishop SP, Uechi M, Vatner DE, Shannon RP, Kudej RK, Wight DC, Wagner TE, Ishikawa Y, Homcy CJ, Vatner SF (1996)

Adverse effects of chronic endogenous sympathetic drive induced by cardiac GS alpha overexpression.

Circ Res.;78:517-24

Iwase M, Uechi M, Vatner DE, Asai K, Shannon RP, Kudej RK, Wagner TE, Wight DC, Patrick TA, Ishikawa Y, Homcy CJ, Vatner SF (1997)

Cardiomyopathy induced by cardiac Gs alpha overexpression.

Am J Physiol; 272: H585-9

Ito H (2006)

No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction

Nature clinical peactise cardiovascular medicine; 3(9): 499-506

Jackson SP (2007)

The growing complexity of platelet aggregation

Blood; 109: 5087-5095

Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S (2003)

Signaling events underlying thrombus formation

Journal of Thrombosis and Haemostasis; 1: 1602–1612

Jantzen HM, Milstone DS, Gousset L, Conley PB, Mortensen RM (2001)

Impaired activation of murine platelets lacking G alpha(i2).

J Clin Invest; 108: 477-83

Jennings RB (1970)

## 10. Literaturverzeichnis

Myocardial Ischemia-Observations, Definitions and Speculations  
Journal of Molecular and Cellular Cardiology; 1(4): 345-349

Jennings RB, Reimer KA (1991)  
The Cell Biology of acute Myocardial Ischemia  
Annu Rev Med; 42: 225-46

Jennings RB, Reimer KA, Steenbergen C (1986)  
Myocardial Ischemia Revisited. The Osmolar Load, Membrane Damage, and Reperfusion  
J Mol Cell Cardiol; 18: 769-780

Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H (1960)  
Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog.  
Arch Pathol; 70: 68-78

Jiang Y, Ma W, Wan Y, Kozasa T, Hattori S, Huang XY (1998)  
The G protein G $\alpha$ <sub>12</sub> stimulates Bruton's tyrosine kinase and a ras GAP through a conserved PH/BM domain.  
Nature; 395: 808-13

Johnson GJ, Leis LA, Dunlop PC (1996)  
Specificity of G $\alpha_q$  and G $\alpha_{11}$  gene expression in platelets and erythrocytes  
Biochem J; 318: 1023-1031

Ju H, Zhao S, Tappia PS, Panagia V, Dixon IMC (1998)  
Expression of G $\alpha_q$  and PLC- $\beta$  in Scar and Border Tissue in heart Failure Due to Myocardial Infarction  
Circulation; 97: 892-899

Kajstura J, Cigola E, Malhotra A, Li P, Cheng W, Meggs LG, Anversa P (1997)  
Angiotensin II induces Apoptosis of adult Ventricular Myocytes in Vitro  
J Mol Cell Cardiol; 29: 859-870

Kang PM, Haunstetter A, Aoki H, Usheva A, Izumo S (2000)  
Apoptosis During Hypoxia and Reoxygenation: Morphological and Molecular Characterization of Adult Cardiomyocyte  
Circ Res; 87: 118-125

Katz AM (1995)  
The cardiomyopathy of overload: an unnatural growth response.  
Eur Heart J; 16: 110-4

Klages B, Brandt U, Simon MI, Schultz G, Offermanns S (1999)  
Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets.  
J Cell Biol; 144: 745-54

Kloner RA (1993)  
Does reperfusion injury exist in humans?  
J Am Coll Cardiol; 21: 537-45

Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB (1974)  
The "No-Reflow" Phenomenon after Temporary Coronary Occlusion in the Dog  
The Journal of Clinical Investigation; 54: 1496-1508

## 10. Literaturverzeichnis

Kulkarni S, Dopheide SM, Yap CL, Ravanat C, Freund M, Mangin P, Heel KA, Street A, Harper IA, Lanza F, Jackson SP (2000)  
A revised model of platelet aggregation  
J Clin Invest; 105: 783–791

Kunapuli SP, Dorsam RT, Kim S, Quinton TM (2003)  
Platelet purinergic receptors..  
Curr Opin Pharmacol; 3: 175-80

Kruppenbacher JP, May Th, Eggers HJ (1993)  
Cardiomyocytes of Adult Mice in Long-Term Culture  
Naturwissenschaften; 80: 132-134

Lauri D, Cerletti C, de Gaetano G (1985)  
Amplification of primary response of human platelets to platelet-activating factor: aspirin-sensitive and aspirin-insensitive pathways.  
J Lab Clin Med;105: 653-8

Lemasters JJ, Bond JM, Chacon E, Harper IS, Kaplan SH, Ohata H, Trollinger DR, Herman B, Cascio WE (1996)  
The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes.  
EXS; 76: 99-114

Leung WH, Stadius ML, Alderman EL (1991)  
Determinants of normal coronary artery dimensions in humans.  
Circulation. 1991 Dec;84(6):2294-306

Lev S, Moreno H, Martinez R, Canoll P, Peles E, Musacchio JM, Plowman GD, Rudy B, Schlessinger J (1995)  
Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions.  
Nature; 376: 737-45

Levin J, Ebbe S (1994)  
Why are recently published platelet counts in normal mice so low?  
Blood 1994 83: 3829-3831

Libby P, Egan D, Skarlatos S (1997)  
Roles of Infectious Agents in Atherosclerosis and Restenosis: An Assessment of the Evidence and Need for Future Research  
Circulation; 96: 4095-4103

Löwel H (2006)  
Heft 33 - Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt  
aus der Reihe "Gesundheitsberichterstattung des Bundes"  
Statistisches Bundesamt Zweigstelle Bonn Gesundheit Graurheindorfer Straße 198 53117  
Bonn gbe-bund@destatis.de

Mac Isaac AI, Thomas JD, Topol EJ (1993)  
Toward the quiescent coronary plaque  
J Am Coll Cardiol; 22: 1228-1241

Manning AS, Hearse DJ (1984)

## 10. Literaturverzeichnis

Reperfusion Induced Arrhythmias: Mechanisms and Prevention  
J Mol Cell Cardiol; 16: 497-518

Maruyama Y, Nishida M, Sugimoto Y, Tanabe S, Turner JH, Kozasa T, Wada T, Nagao T, Kurose H (2002)

G $\alpha_{12/13}$  Mediates  $\alpha_1$ -Adrenergic Receptor-Induced Cardiac Hypertrophy  
Circ Res; 91: 961-969

Martin JL, Avkiran M, Quinlan RA, Cohen P, Marber MS (2001)

Antiischemic Effects of SB203580 are Mediated through the Inhibition of p38 $\alpha$  Mitogen Activated Protein Kinase: Evidence from Ectopic Expression of an Inhibition-Resistant Kinase

Circ Res ;89:750-752

Maxwell MJ, Westein E, Nesbitt WS, Giuliano S, Dopheide SM, Jackson SP (2007)

Identification of a 2-stage platelet aggregation process mediating shear-dependent thrombus formation

Blood, 15 January; 109: 566-576

McFadden EP, Clarke JG, Davies GJ, Kaski JC, Haider AW, Maseri A (1991)

Effect of intracoronary serotonin on coronary vessels in patients with stable angina and patients with variant angina.

N Engl J Med; 324: 648-54

McWhinney C, Wenham D, Kanwal S, Kalman V, Hansen C, Robishaw JD (2000)

Constitutively active Subtypes Reveal Coupling of the  $\beta_{1a}$  and the  $\beta_{1b}$  Adrenergic Receptor Subtypes Reveal Coupling to Different Signaling Pathways and Physiological Responses in Rat Cardiac Myocytes

J Biol Chem; 275: 2087-2097

Meigs TE, Fields TA, McKee DD, Casey PJ (2001)

Interaction of Galpha 12 and Galpha 13 with the cytoplasmic domain of cadherin provides a mechanism for beta -catenin release.

Proc Natl Acad Sci USA; 98: 519-24

Merten M, Chow T, Hellums JD, Thiagarajan P (2000)

A New Role for P-Selectin in Shear-Induced Platelet Aggregation

Circulation; 102: 2045-2050

Methia N, Andre´ P , Denis CV, Economopoulos M, Wagner DD (2001)

Localized reduction of atherosclerosis in von Willebrand factor-deficient mice

Blood; 98: 1424-1428

Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, Hawkins HK, Berens K, Ballantyne CM (1995)

Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model.

Am J Physiol; 269: H2147-54

Milligan G, Mullaney I, McCallum JF(1993)

Distribution and relative levels of expression of the phosphoinositidase-C-linked G-proteins Gq alpha and G11 alpha: absence of G11 alpha in human platelets and haemopoietically derived cell lines.

Biochim Biophys Acta; 1179: 208-12

## 10. Literaturverzeichnis

- Mitcheson SJ, Hancox JC, Levi AJ (1998)  
Cultured adult cardiac myocytes: Future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties  
Cardiovascular Research; 39: 280-300
- Mochizuki S, McLeod KT (1997)  
Effects of Hypoxia and Metabolic Inhibition on Increases in Intracellular Ca<sup>2+</sup> Concentration Induced by Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchange in Isolated Guinea-pig Cardiac Myocytes  
J Mol Cell Cardiol 29, 2979–2987
- Moriya S, Kazlauskas A, Akimoto K, Hirai SI, Mizuno K, Takenawa T, Fukui Y, Watanabe Y, Ozaki S, Ohno S (1996)  
Platelet derived growth factor activates protein kinase C $\epsilon$  through redundant and independent signaling pathways involving phospholipase C $\gamma$  or phosphatidylinositol 3 kinase  
Proc. Natl. Acad. Sci USA; 93: 151-155
- Neer EJ (1995)  
Heterotrimeric G Proteins: Organizers of Transmembrane Signals  
Cell; 80: 249-257
- Neves SR, Ram PT, Iyengar R (2002)  
G Protein Pathways  
Science; 296: 1636-1639
- Nieswandt B, Aktas B, Moers A, Sachs UJH (2005)  
Platelets in atherothrombosis: lessons from mouse models  
J Thromb Haemost; 3: 1725-36
- Nieswandt B, Watson SP (2003)  
Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?  
Blood; 102: 449-61
- Offermanns S (2001)  
In vivo functions of heterotrimeric G-proteins: studies in G $\alpha$ -deficient mice  
Oncogene; 20: 1635-1642
- Offermanns S (2003)  
G-proteins as transducers in transmembrane signaling  
Progress in Biophysics & Molecular Biology; 83: 101-130
- Offermanns S (2006)  
Activation of Platelet Function Through G Protein–Coupled Receptors  
Circ Res; 99: 1293-1304
- Offermanns S, Hashimoto K, Watanabe M, Sun W, Kurihara H, Thompson RF, Inoue Y, Kano M, Simon MI (1997)  
Impaired motor coordination and persistent multiple climbing fiber innervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking G $\alpha_q$   
Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 94: 14089–14094
- Offermanns S, Heiler F, Spicher K, Schultz G (1994)  
G $q$  and G $11$  are concurrently activated by bombesin and vasopressin in Swiss 3T3 cells  
FEBS Lett; 349: 201-4

## 10. Literaturverzeichnis

- Offermanns S, Mancino V, Revel JP, Simon MI (1997)  
Vascular system Defects and Impaired cell Chemokinesis as a Result of  $G\alpha_{13}$  Deficiency  
Science; 275: 533-536
- Offermanns S, Toombs CF, Hu YH, Simon MI (1997)  
Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice.  
Nature; 389: 183-6
- Offermanns S, Zhao LP, Gohla A, Sarosi I, Simon MI, Wilkie TM (1998)  
Embryonic cardiomyocyte hypoplasia and craniofacial defects in Gaq/Ga11-mutant mice  
The Embo Journal; 17: 4304–4312
- Okamura A, Ito H, Iwakura K, Kawano S, Inoue K, Maekawa Y, Ogihara T, Fujii K (2005)  
Detection of embolic particles with the Doppler guide wire during coronary intervention in  
patients with acute myocardial infarction Efficacy of distal protection device (2005)  
J Am Coll Cardiol; 45: 212-215
- Owens LM, Fralix TA, Murphy E, Cascio WE, Gettes LS, (1996)  
Correlation of Ischemia-Induced Extracellular and Intracellular Ion Changes to Cell-to-Cell  
Electrical Uncoupling in Isolated Blood-Perfused Rabbit Hearts  
Circulation; 94: 10-13
- Palokoki E, Saraste A, Eriksson A, Pulkki K, Kallajoki M, Voipio-Pulkki LM,  
Tikkanen I (2001)  
Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction  
in rats  
Am J Physiol Heart Circ Physiol; 280: H2726–H2731
- Petersen S, Peto V, Rayner M, Leal J, Luengo-Fernandez R, Gray A (2005)  
European cardiovascular disease statistics 2005 edition  
BHF, London
- Piper HM (1989)  
Energy deficiency, calcium overload or oxidative stress: possible causes of irreversible  
ischemic myocardial injury.  
Klin Wochenschr; 67: 465-76
- Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M (1998)  
A fresh look at reperfusion injury  
Cardiovascular Research; 38: 291–300
- Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Husain S, Arora S, Gilligan DM, Panza JA, Cannon  
RO (1995)  
Nitric Oxide Activity in the Human Coronary Circulation Impact of Risk Factors for Coronary  
Atherosclerosis  
The Journal of Clinical Investigation; 95: 1747-1755
- Rendu F, Brohard-Bohn B (2001)  
The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions.  
Platelets; 12: 261-73
- Rhee SG (2001)  
Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C  
Annu Rev Biochem; 70: 281-312



## 10. Literaturverzeichnis

- Ruggeri ZM (2000)  
Old concepts and new developments in the study of platelet aggregation  
J Clin Invest 105:699-701
- Ruggeri ZM (2002)  
Platelets in atherothrombosis  
Nature Medicine; 8: 1227-1234
- Schmitt A, Guichard J, Massé JM, Debili N, Cramer EM (2001)  
Of mice and men: Comparison of the ultrastructure of megakaryocytes and platelets  
Experimental Hematology; 29: 1295–1302
- Seki S, MacLeod KT (1995)  
Effects of anoxia on intracellular Ca<sup>2+</sup> and contraction in isolated guinea pig cardiac myocytes  
Am J Physiol Heart Circ Physiol 268: H1045-H1052,
- Sharov VG, Todor A, Suzuki G, Morita H, Tanhehco EJ, Sabbah HN (2003)  
Hypoxia, angiotensin-II, and norepinephrine mediated apoptosis is stimulus specific in canine failed cardiomyocytes: a role for p38 MAPK, Fas-L and cyclin D1  
The European Journal of Heart Failure; 5: 121–129
- Shi CS, Kehrl JH (2001)  
PYK2 Links Gq\_ and G13\_ Signaling to NF- $\kappa$ B Activation  
The Journal of Biological Chemistry; 276: 31845–31850
- Singh K, Xiao L, Remondino A, sawyer DB, Colucci WS (2001)  
Adrenergic Regulation of Cardiac Myocyte Apoptosis  
J Cell Physiol; 189: 257-265
- Solares J, Garcia-Dorado D, Oliveras J, González MA, Ruiz-Meana M, Barrabés JA, Gonzalez-Bravo C, Soler-Soler J (1995)  
Contraction band necrosis at the lateral borders of the area at risk in reperfused infarcts. Observations in a pig model of in situ coronary occlusion.  
Virchows Arch; 426: 393-9
- Soonpaa MH, Kim KK, Pajak L, Franklin M, Field LJ (1996)  
Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development.  
Am J Physiol; 271: H2183-9
- Stone GW, Webb J, Cox DA (2004)  
Primary angioplasty in acute myocardial infarction with distal protection of the microcirculation: principal results from the prospective, randomized EMERALD trial  
J Am Coll Cardiol; 43 Suppl A: A285
- Stone GW, Webb J, Cox DA, Brodie BR, Qureshi M, Kalynych A, Turco M, Schultheiss HP, Dulas D, Rutherford BD, Antoniucci D, Krucoff MW, Gibbons RJ, Jones D, Lansky AJ, Mehran R (2005)  
Distal Microcirculatory Protection during Percutaneous Coronary Intervention in Acute ST-Segment Elevation Myocardial Infarction A Randomized Controlled Trial  
JAMA. 2005;293:1063-1072
- Subramaniam M, Frenette PS, Saffaripour S, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD (1996)  
Defects in hemostasis in P-selectin-deficient mice

## 10. Literaturverzeichnis

Blood; 87: 1238-1242

Sugden PH, Clerk A (1998)

„Stress responsive“ Mitogen-Activated Protein Kinases (c-Jun-Terminal Kinases and p38 Mitogen-Activated Protein kinases) in the Myocardium  
Circ Res; 83: 345-352

Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG (1996)

Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases.  
Annu Rev Pharmacol Toxicol; 36: 461-80

Tanaka Y, M. Gavrielides V, Mitsuuchi Y, Fujii T, Kazanietz MG (2003)

Protein Kinase C Promotes Apoptosis in LNCaP Prostate Cancer Cells through Activation of p38 MAPK and Inhibition of the Akt Survival Pathway  
The Journal of biological chemistry; 278: 33753–33762

Thüroff JW, Hort W, Lichti H (1984)

Diameter of coronary arteries in 36 species of mammalian from mouse to giraffe.  
Basic Res Cardiol; 79: 199-206

Tsakiris DA, Scudder L, Hodivala-Dilke K, Hynes RO, Coller BS (1999)

Hemostasis in the Mouse (*Mus musculus*): A Review  
Thromb Haemost; 81: 177–88

Tschoepe D, Stratmann B (2006)

Plaque stability and plaque regression: new insights  
European Heart Journal Supplements; 8 (Supplement F): F34–F39

Ueda Y, Asakura M, Hirayama A, Komamura K, Hori M, Komada K (1996)

Intracoronary morphology of culprit lesions after reperfusion in acute myocardial infarction: serial angiographic observations  
J Am Coll Cardiol; 27: 606-610

Vatner DE, Yang GP, Geng YJ, Asai K, Yun Js, Wagner TE, Ishikawa Y, Bishop SP, Homcy CJ, Vatner SF (2000)

Determinants of the cardiomyopathic phenotype in chimeric mice overexpressing cardiac  $G_{\alpha s}$   
Circ Res; 86: 802-6

Verdouw PD, van den Doel MA, de Zeeuw S, Duncker DJ (1998)

Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes  
Cardiovascular Research; 39: 121–135

Vink H, Constantinescu AA, Spaan JAE (2000)

Oxidized Lipoproteins Degrade the Endothelial Surface Layer Implications for Platelet-Endothelial Cell Adhesion  
Circulation; 101: 1500-1502

Vinten-Johansen J (2004)

Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury.  
Cardiovasc Res; 61: 481-97

Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD (2002)

Pathology of the unstable plaque

## 10. Literaturverzeichnis

Prog Cardiovasc Dis; 44: 349-56.

Wagner CL, Mascelli MA, Neblock DS, Weisman HF, Collier BS, Jordan RE (1996)  
Analysis of GPIIb/IIIa Receptor Number by Quantification of 7E3 Binding to Human Platelets  
Blood; 88: 907-914

Wang RL, Smrck AV, Sternweis PC, Exton JH (1991)  
Photoaffinity labeling of two rat liver plasma membrane proteins with [<sup>32</sup>P]gamma-azidoanilido GTP in response to vasopressin. Immunologic identification as alpha subunits of the Gq class of G proteins  
J Biol Chem; 266:11409-11412

Watanabe Y, Inaba T, Shimano H, Gotoda T, Yamamoto K, Mokuno H, Sato H, Yazaki Y, Yamada N (1994)  
Induction of LDL Receptor-Related Protein During the Differentiation of Monocyte-Macrophages Possible Involvement in the Atherosclerotic Process  
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.; 14: 1000-1006

Weig HJ, Bott-Flügel L, Städele C, Winter K, Schmidt R, Gawaz M, Laugwitz KL, Seyfarth M (2008)  
Impaired platelet function reduces myocardial infarct size in Gαq knock-out mice in vivo  
Journal of Molecular and Cellular Cardiology; 44: 143–150

Wencker W, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, Shirani J, Armstrong RC, Kitsis RN (2003)  
A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure  
J Clin Invest; 111: 1497–1504

Wenham D, Rahmatullah RJ, Rahmatullah M, Hansen CA, Robishaw JD (1997)  
Differential coupling of alpha1-adrenoreceptor subtypes to phospholipase C and mitogen activated protein kinase in neonatal rat cardiac myocytes.  
Eur J Pharmacol; 339: 77-86

Wettschurek N, Offermanns S (2005)  
Mammalian G proteins and their cell type specific functions.  
Physiol Rev; 85: 1159-204

Wettschurek N, Rütten H, Zywiets A, Gehring D, Wilkie TM, Chen J, Chien KR, Offermanns S (2001)  
Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Gα<sub>q</sub>/ Gα<sub>11</sub> in cardiomyocytes  
Nature Medicine; 7: 1236-1240

Wilkie TM (2000)  
G-protein signaling: Satisfying the basic necessities of life  
Current Biology; 10: R853-R856

Wilkie TM, Scherle PA, Strathmann MP, Slepak VZ, Simon M (1991)  
Characterization of G-protein alpha subunits in the Gq class: Expression in murine tissues and in stromal and hematopoietic cell lines  
Proc Natl Acad Sci USA; 88: 10049-10053

## 10. Literaturverzeichnis

- Wilkie TM, Gilbert DJ, Olsen AS, Chen XN, Amatruda TT, Korenberg JR, Trask BJ, de Jong P, Reed RR, Simon MI (1992)  
Evolution of the mammalian G protein alpha subunit multigene family.  
Nat Genet; 1: 85-91
- Winter K (2006)  
Einfluss des Gαq-Proteins auf die myokardiale Infarktgröße der knochenmarktransplantierten Gαq-Knockout-Maus im Ischämie/Reperusionsmodell  
Veterinärmedizinische Dissertation, München
- Wolska BM, Solaro J (1996)  
Method for isolation of adult mouse cardiac myocytes for studies of contraction and microfluorimetry  
Am J Physiol; 271: H1250-H1255
- Xiao L, Pimental DR, Amin JK, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS (2001)  
MEK 1/2-ERK 1/2 mediated alpha 1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes.  
J Mol Cell Cardiol; 33: 779-87
- Yellon DM, Hausenloy DJ (2007)  
Myocardial Reperfusion Injury  
N Engl J Med; 357: 1121-1135
- Yukitaka S, Buttrick PM, Geenen DL, Borczuk AC, Kitsis RN, Sonnenblick EH  
Beta-Adrenergic stimulation causes cardiocyte apoptosis: influence of tachycardia and hypertrophy (1998)  
Am J Physiol; 275: (Heart Circ. Physiol. 44): H961–H968
- Zaugg M, Xu W, Lucchinetti E, Shafiq SA, Jamali NZ, Siddiqui MAQ (2000)  
β-Adrenergic Receptor Subtypes Differentially Affect Apoptosis in Adult Rat Ventricular Myocytes  
Circulation; 102: 344-350
- Zhou YY, Wang SQ, Zhu WZ, Chruscinski A, Kobilka BK, Ziman B, Wang S, Lakatta EG, Cheng H, Xiao RP (2000)  
Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes: methods for cellular genetic physiology  
Am J Physiol Heart Circ Physiol; 279: H429-H436

## 11. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. M. Seyfarth für die freundliche Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Meinem Betreuer Herrn Dr. med. H.-J. Weig danke ich für die unermütlche fachliche Hilfe und die geduldige Korrektur meiner Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und angenehme Atmosphäre bedanken. Dies gilt insbesondere Herrn Dr. med. vet. C. Städele für die Unterstützung bei den Tierexperimenten und Frau D. Grewe für ihr besonderes Engagement und verständnisvolle Motivation.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau Simone Schlüter für die freiwillige und akribische Fehlersuche bedanken, die mir das Schreiben dieser Arbeit deutlich erleichtert hat.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Frau bedanken, die mich durch alle Höhen und Tiefen begleitet hat und oft auf mich verzichten musste.