

1. Medizinische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

**Qualitative und quantitative Untersuchungen zur Apoptose in der humanen
Herzinsuffizienz**

Heiko Ühlein

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. K.-L. Laugwitz

Die Dissertation wurde am 25.08.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 22.07.2009 angenommen.

1. Einleitung	3
2. Patientendaten im Überblick	5
3. Methoden	6
3.1 Proteinnachweis durch Western Blot	6
3.2 Proteinnachweis durch Immunpräzipitation	10
3.3 ELISA zur Bestimmung der Caspase-3-Aktivität	12
3.4 ELISA zur Bestimmung der DNA-Histon-Fragmentation	14
4. Resultate	15
4.1 Apoptosemarker in der akuten versus chronischen Herzinsuffizienz	15
4.1.1 Caspase-3-Aktivität	15
4.1.2 DNA-Histon-Fragmentation	16
4.1.3 Fehlende Korrelation zu Hämodynamik und Medikation	18
4.2 Spaltung kontraktiler Proteine und des Gelsolins	20
5. Diskussion	25
5.1 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz	25
5.2 Apoptose in Kardiomyozyten	26
5.3 Akute versus chronische Herzinsuffizienz	28
5.4 Fehlende Korrelation zu Hämodynamik und Medikation	37
6. Zusammenfassung	38
7. Anhang	39
8. Abkürzungen	51
9. Literaturverzeichnis	54
10. Eigene Veröffentlichung	60

1. Einleitung

Eine der führenden Krankheiten stellt die chronische Herzinsuffizienz dar. Entsprechend epidemiologischer Daten rechnet man derzeit mit etwa 10 Millionen herzinsuffizienter Patienten europaweit, darunter mehr als zwei Millionen Patienten in Deutschland. Sowohl Prävalenz als auch Inzidenz sind mit dem Alter zunehmend. So wird davon ausgegangen, dass weniger als ein Prozent der Menschen zwischen 45 und 55 Jahren und etwa zehn Prozent der über 80-Jährigen an einer Herzinsuffizienz erkrankt sind (Mc Murray et al. 2000). In Folge der sich wandelnden demographischen Struktur unserer Gesellschaft mit steigender Lebenserwartung wird in Zukunft mit einem weiteren Anstieg der Prävalenz und Inzidenz von herzinsuffizienten Patienten zu rechnen sein.

Die primäre Ätiologie der chronischen Herzinsuffizienz ist vielfältig. Vor allem der koronaren Herzkrankheit, die in mehr als der Hälfte aller Patienten ursächlich ist (57%) kommt eine herausragende Bedeutung zu. Ferner spielen Hypertonie (7%) und weitere Erkrankungen wie beispielsweise Kardiomyopathien und Myokarditiden eine beachtliche Rolle (5%), wobei aber nicht vergessen werden darf, dass in 31% der Fälle die Ursache nicht geklärt werden kann (Cohn et al. 2001).

Intensive Bestrebungen bestehen darin, die mit der Herzinsuffizienz einhergehenden molekularen Veränderungen aufzuklären, um darüber letztendlich neue Therapieansätze zu entwickeln. Ältere Studien zeigten bereits, dass in Kardiomyopathien ein progredienter Verlust von Kardiomyozyten besteht (Anversa et al. 1993, Bing et al. 1994, Beltrami et al. 1995), der hauptsächlich auf den programmierten Zelltod, auch Apoptose genannt, zurückgeführt wird.

Die Apoptose oder der programmierte Zelltod ist im Gegensatz zu anderen Formen des Zelltodes wie beispielsweise Nekrose morphologisch gekennzeichnet durch Schrumpfung der Zelle und des Zellkerns, Kondensation des nukleären Chromatins zu scharf abgrenzbaren Körpern, Zerfall des Zellkerns (Karyorrhesis) sowie Bildung und Phagozytose der aus den verbliebenen Zellorganellen aufgebauten Apoptosekörpern. Wesentlich dabei ist, dass keine begleitende Inflammation induziert wird (Saraste et al. 2000).

Molekularbiologisch ist die Apoptose unter anderem charakterisiert durch den Nachweis von Caspasen. Dies sind Enzyme, die für die Zerstörung zellulärer Proteine verantwortlich sind

und damit Aufgaben in der Ausführung des programmierten Zelltodes erfüllen. Dabei wird differenziert zwischen den Initiatorcaspasen, die beim Prozess der Apoptose frühzeitig aktiviert werden und den Effektorcaspasen, die zum Teil von den Initiatorcaspasen aktiviert, relativ am Ende der Kaskade stehen und die eigentliche Proteindegradation vornehmen. Zu einer dieser Effektorcaspasen wird die Caspase-3 gezählt, die neben der organisierten Zerstörung überlebenswichtiger zellulärer Proteine die Aktivierung spezieller DNAsen ermöglicht und damit einhergehend eine Zerkleinerung der chromosomalen DNA in apoptose-typische DNA-Histon-Fragmente der Basenlänge von etwa 180 kb bewirkt. Die Caspase-3 wird in den Kardiomyozyten über drei unterschiedliche Mechanismen aktiviert.

Sowohl im Tiermodell als auch über in vitro Versuche ist belegt, dass eine Degradation verschiedener kontraktile Proteine in Fragmente bestimmter Größe nach Caspase-Inkubation stattfindet (Moretti et al. 2002, Communal et al 2002). Darüber hinaus zeigen die Untersuchungen dieser beiden Arbeitsgruppen, dass die Aktivierung der Caspase-3 zum einen direkt die kontraktile Fähigkeit untergehender ventrikulärer Myozyten durch Degradation kontraktile Proteine beeinflusst (Laugwitz et al. 2001) und zum anderen zu einer signifikanten Abnahme der über Ca^{2+} -Ionen getriggerten Kraft in isolierten Fasern von Kaninchenherzen führt (Communal et al. 2002). Eine Aktivierung der Caspase-3 kann somit zu einer Verschlechterung kardialer Funktion beitragen und auf molekularer Ebene eine Ursache für Herzinsuffizienz darstellen.

Die vorliegende Doktorarbeit knüpft an diese Studien an. Es werden Gewebeproben von Patienten untersucht, die entweder an einer ischämischen oder einer dilatativen Kardiomyopathie erkrankt sind. Diese Proben werden auf das Vorhandensein spezieller apoptotischer Spaltprodukte, die speziell den kontraktilem Apparat betreffen, getestet und die Resultate vor dem Hintergrund der Apoptose diskutiert.

2. Patientendaten im Überblick

In der folgenden Tabelle 1 sind die klinischen Daten der Patienten mit ischämischer und dilatativer Kardiomyopathie sowie die Daten der Kontrollpersonen dargestellt. Im Anhang sind die vollständigen Datensätze zu jedem einzelnen Patienten dokumentiert (Tabelle 2-5).

Parameter	DCM	ICM	Kontrollen
Anzahl	25	19	5
Alter [Jahre]	45,1 +/- 3,3	57,8 +/- 1,8	47,4 +/- 3,7
weiblich [%]	24	11	na
Krankheitsdauer [Jahre]	8,6 +/- 1,6	8,5 +/- 1,1	0
Ejektionsfraktion [%]	21 +/- 1	28 +/- 5	na
CO [l/min]	3,7 +/- 0,3	4,0 +/- 0,3	na
CI [l/min/m ²]	1,9 +/- 0,1	2,1 +/- 0,1	na
PAP [mmHg]	33 +/- 2	34 +/- 3	na
PCWP [mmHg]	24 +/- 2	21 +/- 2	na
RAP [mmHg]	8 +/- 1	8 +/- 1	na
Betablocker [%]	68	68	na
ACE-I/AT-I Antagonisten [%]	84	79	na
Diuretika [%]	84	84	na
Amiodaron [%]	20	16	na
Digitalis [%]	36	53	na
Statine [%]	12	53	na
Katecholamine [%]	12	11	na
Assist Devices [%]	12	11	0

Tabelle 1

Insgesamt werden 49 Personen in die Untersuchung eingeschlossen, wobei neben den fünf herzgesunden Kontrollpersonen 25 Patienten an einer dilatativen Kardiomyopathie und 19 Patienten an einer ischämischen Kardiomyopathie erkrankt waren. Die Ejektionsfraktion in der DCM-Patientenkohorte ist mit lediglich 21% im Vergleich zur ICM-Patientenkohorte mit 28% geringfügig schlechter. Die weiteren hämodynamischen Parameter belegen die zu Grunde liegende Herzinsuffizienz in beiden Patientenkohorten. Fünf Patienten erhielten im Vorfeld ein mechanisches Kreislaufunterstützungssystem, ein sogenanntes Assist Device. Dabei handelt es sich in der ICM-Patientenkohorte um zwei Left Ventricular Assist Devices (LVAD) bei den Patienten ICM 5 und ICM 16. In der DCM-Patientenkohorte erhielt Patient DCM 16 und Patient DCM 23 einen LVAD während Patient DCM 11 eine intra-aortale Ballonpumpe (IABP) implantiert bekam. Drei Patienten der DCM-Gruppe (DCM 19, DCM 21, DCM 25) und zwei Patienten der ICM-Gruppe (ICM 1, ICM 7) waren katecholaminpflichtig.

3. Methoden

3.1 Proteinnachweis durch Western Blot

Für die in dieser Arbeit verwendeten Materialien soll auf Grund des Umfangs auf den Anhang verwiesen werden. Aufgelistet sind dabei die Geräte, Verbrauchsmaterialien und Hilfsgegenstände (Tabelle 8, S.45) sowie die Chemikalien, Proteine und Lösungen (Tabelle 9, S.46).

Im Folgenden wird zunächst die proteinchemische Aufbereitung der tiefgekühlten Myokardbiopsien erläutert. Zu beachten ist, dass alle einzelnen Schritte auf Eis ausgeführt werden. Von der bei -82°C gelagerten humanen myokardialen Gewebeprobe aus dem linken Ventrikel werden ungefähr 100 mg mittels Skalpell abgetrennt und nach Antauen mit dem auf Eis gekühlten nicht denaturierenden Puffer versetzt. Die Zugabe von Proteaseinhibitoren stoppt die Restaktivität vorhandener Enzyme. Anschließend wird die Gewebeprobe mittels Ultra Turrax homogenisiert und für die folgenden 30-60 Minuten auf Eis inkubiert. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 4°C und $15\,000 \times g$ erhält man den Überstand, in dem sich die zytosolische Zellfraktion befindet. Das zurückbleibende Pellet kann erneut eingefroren und für spätere Verwendungszwecke aufbewahrt werden.

Als Negativkontrolle wird explantiertes Myokardgewebe herzgesunder Menschen verwendet. Als Positivkontrollen dienen $50 \mu\text{g}$ synthetisches Protein oder $100 \mu\text{g}$ des Gewebes herzkranker Patienten. Die Proben werden mit wenigen Mikroliter synthetischer aktiver Caspase-3 versetzt. Die Zugabe eines Reaktionsbeschleunigers unterstützt die stattfindenden Vorgänge.

Die Bestimmung des Proteingehalts der einzelnen Fraktionen erfolgt nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Hierbei bilden Proteine Komplexe mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliantblau, das bei 630 nm photometrisch quantifiziert werden kann. Über bekannte BSA-Konzentrationen wird eine Eichkurve ermittelt, die dann zur Proteinkonzentrationsbestimmung der humanen Fraktion herangezogen wird. Um Fehler beim Pipettieren auszugleichen erfolgt jeweils eine Doppelbestimmung des Proteingehalts. Bei den Western Blots werden Proteinmengen von $100 \mu\text{g}$ pro Fraktion benötigt.

Über den so ermittelten Proteingehalt jeder einzelnen Fraktion können die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit jeweils 100 µg Protein bestückt werden. Sowohl zu den Patientenfraktionen als auch zu den Kontrollfraktionen gibt man im Anschluss den sechsfach konzentrierten SDS-Probenpuffer. Das im Puffer enthaltene SDS überdeckt die Eigenladung der Aminosäuren und entfaltet die Proteine, so dass eine Auftrennung nach Molekulargewicht möglich wird. Anschließend erhitzt man sämtliche Proben für drei Minuten bei 100°C im Heizgerät, um noch vorhandene endogene Proteasen, die im SDS-Puffer sehr aktiv sind, zu zerstören. Die Proben werden im Anschluss in die Polyacrylamid-Gelelektrophorese geladen.

Die Bedeutung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese liegt in der Auftrennung der Proteingemische in ihre Bestandteile. Dies wird durch Gele unterschiedlicher Polyacrylamidkonzentrationen ermöglicht. Die Konzentration des Polyacrylamidgels ist ein Maß für die im Gel vorhandene Porengröße und somit der Penetrierbarkeit der unterschiedlich großen Proteine während der Elektrophorese. Proteine mit niedrigem molekularem Gewicht werden durch eine zu kleine Porengröße weniger behindert als solche mit hohem molekularem Gewicht und legen deshalb einen weiteren Weg zurück.

Zum Aufbau der Elektrophoreseeinheit werden zwei verschieden große Glasplatten der Art aufeinandergelegt, dass zwischen diesen ein Hohlraum besteht, in den man das vorbereitete Trenngel pipettiert. Anschließend bedeckt man das Trenngel mit einer Schicht 70%igen Ethanol, um einerseits das Gel vor Sauerstoffeinwirkung zu schützen und andererseits eine ebene Oberfläche des Gels zu erreichen. Nach 45 Minuten ist das Gel bei Raumtemperatur polymerisiert, der Alkohol wird abgegossen und durch mehrmaliges Waschen mit destilliertem Wasser entfernt. Nun wird das Sammelgel zwischen die Glasplatten pipettiert und in das noch flüssige Gel ein spezieller Kunststoff-Kamm eingesetzt, der mit seinen breiten Zinken die späteren Taschen für die einzelnen Proteinfractionen bildet. Nach erneuter 45minütiger Polymerisationszeit wird der Kamm entfernt, das Sammelgel mit destilliertem Wasser bedeckt und die Apparatur in eine mit dem einfach konzentrierten SDS-Laufpuffer aufgefüllte Elektrophoresekammer gestellt. Die vorbereiteten Proteinfractionen werden in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Die Elektrophorese startet mit Anlegen einer elektrischen Spannung von zunächst 100 Volt, die im weiteren Verlauf auf 180 Volt gesteigert wird. Dadurch wandern die Proteinfractionen in das Trenngel und werden in ihre Bestandteile aufgetrennt. An Hand eines mitlaufenden Markerproteins ist die Auftrennung der nicht sichtbaren Proteinfractionen gemäß ihrer Größe in Kilodalton nachvollziehbar. Nach erfolgter

Separation wird die Elektrophorese beendet, der einfach konzentrierte SDS-Laufpuffer verworfen und das Trenngel mit der aufgetrennten Proteinfraction für den Western Blot vorbereitet.

Beim Elektro-Transfer von Proteinen wird ein elektrisches Feld erzeugt, über das die im Trenngel lokalisierten Proteine auf die Oberfläche einer Nitrocellulosemembran übergeführt werden.

Praktisch wird das Trenngel vollständig mit einer zuvor in Western-Blot-Puffer getränkten Nitrozellulosemembran bedeckt und diese Einheit zwischen zwei Filterpapiere gelegt und in ein Plastikgestell eingespannt. Die Seite des Gels, die der Nitrozellulosemembran anliegt, entspricht der Kathodenseite. Das Plastikgestell wird derart in die Blot-Halterung eingeführt, dass die Nitrozellulosemembran auf Seiten der Anode orientiert ist. Gemeinsam mit einem Kühlelement wird die Blot-Halterung in die Blot-Kammer gestellt und diese mit Western-Blot-Puffer aufgefüllt. Nach Anlegen der Elektroden an die Halterung und Einstellen der Stromstärke auf 250 mA erfolgt der elektrophoretische Transfer der Proteine vom Trenngel auf die Nitrozellulosemembran. Nach Abschluss des einstündigen Blotvorganges wird das Trenngel verworfen und die Nitrozellulosemembran zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Um den korrekten Ablauf des Transfervorganges sicherzustellen, werden unspezifisch sämtliche transferierten Proteine auf der Nitrozellulosemembran mit Ponceau S-Lösung reversibel angefärbt. Anschließend wird das Ponceau S mit destilliertem Wasser vollständig entfernt. Die Färbung hat keinen Einfluss auf die spätere Antikörperbindung.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran erfolgt die Zugabe einer Proteinlösung. Dies wird durch eine mindestens zwei Stunden andauernde Inkubation der Nitrozellulosemembran in Magermilchlösung bei Raumtemperatur und 50 rpm auf dem Schüttler erreicht.

Zwar liefert die Ponceau S-Lösung Informationen über einen geglückten Blotvorgang durch die Anfärbung von Proteinbanden, dennoch kann sie keine Aussagen darüber treffen, ob ein bestimmtes spezifisch nachzuweisendes Protein bzw. dessen Spaltprodukte auf der Nitrozellulosemembran wirklich vorhanden sind. Dafür benötigt man einen primären Antikörper, der mit seinen Antigenbindungsstellen direkt an das gesuchte Protein bzw.

Antigen bindet. Ein sekundärer Peroxidase-gekoppelter Antikörper erkennt und bindet spezifisch an den entstandenen Antigen-Antikörper-Komplex und macht diesen durch eine kolorimetrische Reaktion sichtbar.

Die einzelnen Schritte finden bei Raumtemperatur und auf dem Schüttler statt. Nach Beenden der Inkubation in Magermilchlösung wird die Nitrozellulosemembran für zehn Minuten mit TBST gespült, um damit mögliche Rückstände störender Biotins zu entfernen. Nach Hinzufügen des primären Antikörpers in der korrekten, vom Hersteller empfohlenen Verdünnung bindet dieser innerhalb einer Stunde an das gesuchte Protein. Daraufhin wird die Membran für jeweils 15 Minuten dreimal gewaschen, davon zweimal mit TBST und einmal mit TBS. Nach Zugabe eines im Verhältnis 1:10000 in TBST verdünnten sekundären Antikörpers bindet dieser innerhalb einer Stunde an den primären Antikörper. Bevor sich die 30 Minuten andauernde Inkubation mit Streptavidin-HRP-Stammlösung anschließt, erfolgen zunächst Waschschrte mit TBST und PBST für jeweils fünfzehn und zweimal fünf Minuten, eine zehnminütige Inkubation in 1x BAR – Lösung und zwei jeweils zweimal stattfindende stets fünfminütige Waschschrte mit 20% DMSO/PBST und PBST. Zweimal wird die Membran für jeweils fünf Minuten mit PBST gewaschen. Als letzter Schritt des Western Blots wird die Nitrozellulosemembran mit der Opti4CN Substratlösung inkubiert. Dadurch wird bei Vorhandensein des gesuchten Proteins die von der Meerrettich-Peroxidase (=horseradish peroxidase) katalysierte kolorimetrische Reaktion in Gang gesetzt. Bei Erreichen der gewünschten Farbintensität wird die enzymatische Reaktion durch Waschen in destillierten Wasser beendet. Nicht selten erscheinen aber neben der gesuchten Proteinbande auch weitere unspezifische Banden, weshalb ein Vergleich mit dem mitgeführten Markerprotein notwendig ist. Als letzter Schritt wird die Membran erneut mit destillierten Wasser gewaschen, getrocknet und für die Auswertung eingescannt.

3.2 Proteinnachweis durch Immunpräzipitation

Nicht alle Proteine sind in ausreichender Konzentration im Zytosol vorhanden, um sie über Western Blot nachweisen zu können. Für den Nachweis niedrig exprimierter Proteine, wie zum Beispiel vMLC-1 ist die Methode der Wahl die Immunpräzipitation.

Die Immunpräzipitation ist ein Verfahren, geringste Mengen eines gewünschten Antigens über einen an eine Sedimentationsmatrix gekoppelten spezifischen Antikörper aufzuspüren und dieses Antigen durch einen sich anschließenden Zentrifugationsschritt zu isolieren.

Notwendigerweise muss das im Zytosol gelöste Antigen, hier das Protein vMLC-1 in eine für den Antikörper zugängliche Form überführt werden. Dies wird erreicht, indem ein nicht denaturierender Puffer den Gewebeproben hinzugefügt wird und durch die sich einsetzende Zellyse eine Freisetzung der zellulär gelösten Antigene möglich wird. Die Zugabe eines spezifisch an das Antigen bindenden primären Antikörpers führt jedoch nicht allein zum Erfolg, da erst die zusätzliche, nichtkovalente Ankopplung einer Sedimentationsmatrix an den Antikörper eine Isolierung des im Antigen-Antikörper-Komplex befindlichen Antigens durch Zentrifugation ermöglicht. Die Sedimentationsmatrix besteht einerseits aus dem von Streptokokken der Gruppe G isolierten Protein G und andererseits aus Sepharose-Kugeln, die eine kovalente Verbindung miteinander eingehen. Im Anschluss wird das Protein über einen Immunblot sichtbar gemacht.

Praktisch werden zur Sepharose-G-Lösung 100 µg des Antikörpers Anti-MLC-1 pipettiert. Im Anschluss erfolgt eine mindestens einstündige Inkubation bei Über-Kopf-Rotation und 4°C. Nach zehn Sekunden Rotation bei 5000 x g und 4°C gewinnt man sowohl einen Überstand als auch ein Pellet. Der Überstand wird verworfen und der im Pellet befindliche und an die Sedimentationsmatrix Sepharose-G gekoppelte Antikörper mit 1 ml der nicht denaturierenden Pufferlösung versetzt und mehrmals vorsichtig resuspendiert. Durch weiteres, wie oben beschriebenes Zentrifugieren, Resuspendieren und erneutes Zentrifugieren erhält man nach Entfernen des Überstandes ein Pellet, das bis zur weiteren Verwendung maximal sechs Stunden auf Eis gekühlt werden darf.

Während bei einem Western Blot Proteinmengen von 100 µg pro Fraktion ausreichen, werden bei der Immunpräzipitation weit höher konzentrierte Fraktionen benötigt. Über die bereits beschriebene Methode nach Bradford wird das Volumen mit einem Proteingehalt von 3 mg

ermittelt und mit dem nicht denaturierenden Puffer auf einen Milliliter aufgefüllt. Die gewonnene Proteinfraction wird bis zum Beginn der Reinigungsschritte entweder auf Eis gekühlt oder für spätere Verwendung bei -82°C tiefgekühlt.

Um zu vermeiden, dass einerseits irgendwelche Proteine der Proteinfraction an die mit monoklonalen Antikörpern bestückte Sedimentationsmatrix binden und die Antigen-Antikörper-Komplexbildung behindern und andererseits unlösliches Material, welches bis dahin noch nicht entfernt wurde ebenfalls die Immunpräzipitation stört, erfolgen zunächst mehrere Reinigungsschritte. Hierfür werden $30\ \mu\text{l}$ der zu 50% in PBS gelösten Sedimentationsmatrix Sepharose G-Protein zur Proteinfraction mit dem gesuchten Protein pipettiert. Nach einer halben Stunde Inkubation bei 4°C und Über-Kopf-Rotation wird durch fünfminütige Zentrifugation mit $15\ 000\ \times\ \text{g}$ eine Auftrennung in Pellet und Überstand erreicht. Das Pellet wird verworfen und der Überstand mit der gereinigten Proteinfraction erneut mit der gleichen Menge an Sedimentationsmatrix Sepharose-G versetzt. Das Waschen wird zweimal wiederholt und nach dem letzten Reinigungsschritt der Überstand mit dem gesuchten Protein vMLC-1 aufbewahrt.

Die mit den Antikörpern bestückte Sepharose-G-Lösung wird mit $10\ \mu\text{l}$ einer 10%igen BSA-Lösung versetzt und anschließend die mehrmals gereinigte Proteinfraction mit dem gesuchten Protein hinzu pipettiert. Eine zwei Stunden andauernde Über-Kopf-Rotation bei 4°C ermöglicht die Bindung des Antigens vMLC-1 an den entsprechenden Antikörper Anti-MLC-1. Durch mehrere Sekunden andauernde Zentrifugation bei $15\ 000\ \times\ \text{g}$ und 4°C erreicht man die Isolierung des Antigen-Antikörper-Komplexes im Pellet. Sollen weitere Proteine isoliert werden, so kann der Überstand bis maximal einem Monat bei -70°C aufbewahrt werden. Durch Resuspendierung des Pellets in einem Milliliter des eisgekühlten nicht denaturierenden Puffers und nachfolgender Zentrifugation bei $15\ 000\ \times\ \text{g}$ und 4°C für zehn Sekunden erfolgt eine erneute Auftrennung in Überstand und gereinigtes Pellet. Die Reinigungsschritte werden drei Mal wiederholt. Nach dem letzten Reinigungsschritt mit eisgekühlten PBS wird dem den Antigen-Antikörper-Komplex beinhaltenden Pellet $15\ \mu\text{l}$ einfach konzentrierter SDS-Probenpuffer zugegeben und für 10 Minuten bei 100°C im Heizgerät erhitzt. Der durch fünfminütige Zentrifugation bei $15000\ \times\ \text{g}$ und 4°C gewonnene Überstand mit dem darin enthaltenen gesuchten vMLC-1 Protein wird in eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese überführt. Die weiteren Schritte sind identisch mit denen des Western Blots.

3.3 ELISA zur Bestimmung der Caspase-3-Aktivität

Der von R&D in den Handel gebrachte ELISA „Quantikine human active caspase-3“ ist in der Lage, die Konzentration humaner aktiver Caspase-3 in einem Zellextrakt zu bestimmen. Die aus jeweils zwei identischen kleinen und großen Untereinheiten aufgebaute aktive Caspase-3 entsteht durch Caspase-8 oder Caspase-9 getriggerte proteolytische Spaltung des Caspase-3-Vorläuferproteins. Im Sandwich-Verfahren werden über eine mit Anti-Caspase-3 vorbestückte Mikrotiterplatte sowohl Caspase-3-Vorläuferprotein als auch aktive Caspase-3 aus dem Zellextrakt fixiert. Die Zugabe des biotinylierten Caspase-Inhibitors zum Zellextrakt ermöglicht die Differenzierung zwischen Caspase-3 Vorläuferprotein und aktiver Caspase-3, da der Inhibitor ausschließlich mit der großen Untereinheit der aktiven Caspase-3 eine kovalente Bindung eingeht. Anschließend wird durch Streptavidin-HRP Stammlösung die biotinmarkierte große Untereinheit der aktiven Caspase-3 markiert. Nach Zugabe der Substratlösung erfolgt im Fall der Anwesenheit aktiver Caspase-3 eine kolorimetrische Reaktion, die nach etwa einer halben Stunde Inkubation in einem Photometer gemessen werden kann. Über mitlaufende Standardproben wird die Auswertung über eine Standardkurve ermöglicht.

Zunächst erfolgt die Zubereitung neuer zytosolischer Zellfraktionen (s. 3.1). Auf die Zugabe eines Proteaseinhibitorcocktails wird verzichtet, um eine mögliche Interferenz zwischen den Proteaseinhibitoren und dem biotinylierten Caspase-Inhibitor auszuschließen. Über die Methode nach Bradford wird das Volumen der zytosolischen Zellfraktion bestimmt, welches nach vorheriger Austestung die notwendige Proteinmenge von 300 µg enthält. Die Proteinfraction wird mit der Pufferlösung auf 100 µl ergänzt, zusätzlich 0,2 µl des 5 mM biotinylierten Caspase-Inhibitors zur Bindung an die große Untereinheit der aktiven Caspase-3 zugesetzt und eine Stunde inkubiert. Diese als auch alle sich anschließenden Inkubationen erfolgen bei Raumtemperatur und auf dem Plattenschüttler. Zwischenzeitlich kann die Verdünnungsreihe des aktiven-Caspase-3-Standards beginnend mit einer Konzentration von 20 ng/ml vorbereitet werden. Über sechs Halbierungsstufen wird die Konzentration bis auf 0,31 ng/ml reduziert. Jeweils 100 µl dieser sechs Standardkonzentrationen werden neben der als Leerwert dienenden Pufferlösung und der 300 µg enthaltenen Proteinfraction in die mit Antikörpern bestückten Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Bei der zweistündigen Inkubation erfolgt die spezifische Bindung des Caspase-3 Vorläuferproteins und der aktiven Caspase-3 an die mit Anti-Caspase-3 bestückte Mikrotiterplatte. Danach werden die Inhalte

aus den Vertiefungen verworfen und fünf Reinigungsschritte mit Waschpuffer angehängt. Die verwendeten Vertiefungen der Mikrotiterplatte werden für eine Stunde mit jeweils 100 µl der Streptavidin-HRP Stammlösung gefüllt. Nach erneutem fünfmaligen Reinigen mit Waschpuffer erfolgt für 30 Minuten unter Lichtschutz die Zugabe von 100 µl Substratlösung, womit die Farbreaktion in Gang gesetzt wird. Ein Farbumschlag vom einem blauen in einen gelben Farbton findet statt. Durch Zugabe von 100 µl Blockadelösung wird die enzymatische Reaktion beendet. Die Farbintensität ist proportional der Konzentration an gebundener aktiver Caspase-3 und wird über ein Photometer bei einer Wellenlänge von 450 Nanometer bestimmt.

3.4 ELISA zur Bestimmung der DNA-Histon-Fragmentation

Der von Roche entwickelte „Cell Death Detection ELISA plus“ bedient sich eines photometrischen Enzym-Immunoassays für die qualitative und quantitative in vitro Bestimmung von zytoplasmatisch lokalisierten histon-assoziierten DNA-Fragmenten, die als Zeichen stattfindender Apoptose gewertet werden. Nach Zugabe zweier verschiedenener Antikörpertypen zur zytosolischen Zellfraktion bindet der eine Typ an die Histonkomponente des Nukleosoms und der andere Typ an die DNA-Komponenten des gleichen Nukleosoms. Während der erstgenannte über seine zusätzliche Biotinylierung eine Bindung und Isolierung des Nukleosoms an eine mit Streptavidin bestückte Mikrotiterplatte ermöglicht, erfolgt über die im anderen Antikörper integrierte Peroxidase-Aktivität eine photometrisch messbare Umwandlung der nachträglich hinzugefügten Substratlösung ABTS.

Zunächst werden zytosolische Zellfraktionen hergestellt und der Proteingehalt mittels der Methode von Bradford bestimmt. Pro zytosolischer Zellfraktion werden 200 µg Protein benötigt. Im Anschluss wird gemäß den Ausführungen des Herstellers eine Immunreagenzlösung, bestehend aus den beiden bereits erwähnten Antikörpertypen und eines Inkubationspuffers vorbereitet. Eine Vertiefung der mit Streptavidin bestückten Mikrotiterplatte wird mit 20 µl Inkubationspuffer, eine weitere Vertiefung mit 20 µl der positiven Kontrolle und die restlichen Vertiefungen mit den 200 µg Protein enthaltenen zytosolischen Zellfraktionen versehen. In alle vorpipettierten Vertiefungen werden 80 µl Immunreagenzlösung hinzugefügt. Nach zweistündiger Inkubation auf dem Schüttler mit 300 rpm bei Raumtemperatur werden die Inhalte der Vertiefungen verworfen, die Vertiefungen dreimal mit 300 µl Inkubationspuffer gereinigt und 100 µl der zuvor angesetzten Substratlösung ABTS hinzugefügt. Als Negativkontrolle wird eine bisher nicht genutzte Vertiefung ebenfalls mit der Substratlösung ABTS gefüllt. In den kommenden Minuten setzt eine Farbreaktion ein, dessen Intensität mittels Photometer bei 405 Nanometer bestimmt wird.

Die ermittelten Extinktionswerte werden daraufhin über die mitgeführte Positivkontrolle entsprechen der Herstellerangaben normalisiert.

4.Resultate

4.1 Apoptosemarker in der akuten versus chronischen Herzinsuffizienz

Um eine Aussage über das Ausmaß der Apoptose in den myokardialen Proben herzinsuffizienter Patienten zu ermöglichen, werden über zwei unterschiedliche ELISA sowohl die Caspase-3-Aktivitäten als auch die Menge von histon-assoziierten DNA-Fragmenten bestimmt. Zusätzlich wird die apoptosetypische Spaltung kontraktiler, myokardialer Proteine mittels Western-Blot und Immunopräzipitation untersucht.

4.1.1 Caspase-3-Aktivität

Wir können zeigen, dass Patienten, die kardial akut dekomensieren, eine signifikant höhere Caspase-3-Aktivität aufweisen als Herzen von Patienten mit stabiler chronischer Herzinsuffizienz (Abbildung 1). So beträgt die Caspase-3-Aktivität bei Patienten mit akuter Herzinsuffizienz $2,0 \pm 0,4$ ng/ml. Bei Patienten mit DCM (Caspase-3-Aktivität: $1,1 \pm 0,2$ ng/ml) oder ICM (Caspase-3-Aktivität: $0,8 \pm 0,1$ ng/ml) ist die Caspase-3-Aktivität signifikant niedriger und unterscheidet sich nicht von den Werten der Kontrollgruppe ($p < 0,01$). Fünf Patienten aus der Patientengruppe mit akuter Herzinsuffizienz waren katecholaminpflichtig (DCM 19, DCM 21, DCM 25, ICM 1, ICM7). Die Patienten DCM 23 und ICM 16 wurden mit einem LVAD versorgt, ein weiterer Patient erhielt eine intra-aortale Ballongegenpulsation (DCM 11).

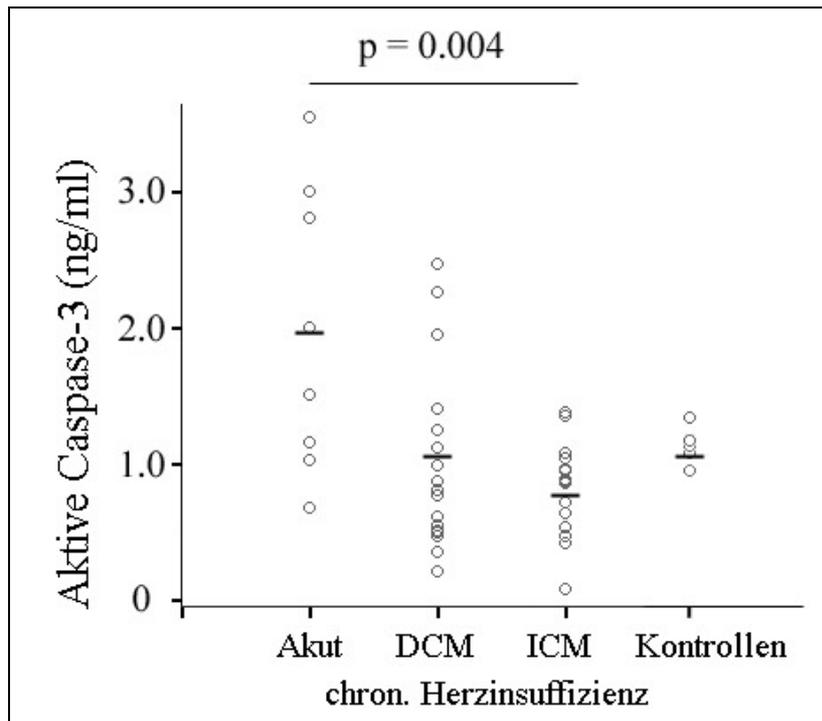


Abbildung 1

Die durchschnittliche Caspase-3-Aktivität aller Proben beträgt $1,10 \pm 0,1$ ng/ml und ist als niedrig einzustufen. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit dilatativer (Caspase-3-Aktivität: $1,3 \pm 0,2$ ng/ml) oder ischämischer Kardiomyopathie (Caspase-3-Aktivität: $1,0 \pm 0,1$ ng/ml). Die Daten zur aktiven Caspase-3 aller Patienten finden sich aufgelistet in Tabelle 6 des Anhanges.

4.1.2 DNA-Histon-Fragmentation

Das Vorhandensein histon-assoziiierter DNA-Fragmente mit festgelegter Basenpaarlänge ist aufgrund Caspase-induzierter Schädigung des Chromosomensatzes ebenfalls Ausdruck stattfindender Apoptose. Die beim „Cell Death Detection ELISA“ photometrisch ermittelten Extinktionswerte sind im Anhang zusammengefasst (Tabelle 6) und beschreiben die durchschnittliche relative Anzahl an histon-assoziierten DNA-Fragmenten. Diese beträgt unter Berücksichtigung aller Proben $0,61 \pm 0,04$ und ist als niedrig einzustufen. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit dilatativer (histon-assoziierte DNA-Fragmente: $0,6 \pm 0,1$) und ischämischer (histon-assoziierte DNA-Fragmente: $0,6 \pm 0,1$) Kardiomyopathie gezeigt werden.

Im Gegensatz zur Caspase-3-Aktivität liegt bei den an akuter Herzinsuffizienz erkrankten Patienten keine signifikante Zunahme der histon-assoziierten DNA-Fragmente vor. So beträgt die relative Anzahl der histon-assoziierten DNA-Fragmente bei den Patienten mit akuter Herzinsuffizienz $0,6 \pm 0,1$. Bei den verbliebenen Patienten mit chronischer DCM (DNA-Histon-Fragmente $0,6 \pm 0,1$) oder chronischer ICM (DNA-Histon-Fragmente $0,6 \pm 0,1$) ist die relative Anzahl der histon-assoziierten DNA-Fragmente annähernd gleich (Abbildung 2). Somit kommt es trotz deutlicher Zunahme der Caspase-3-Aktivität in der akuten kardialen Dekompensation nicht zu einer Zunahme der Caspase-assoziierten DNA-Degradation.

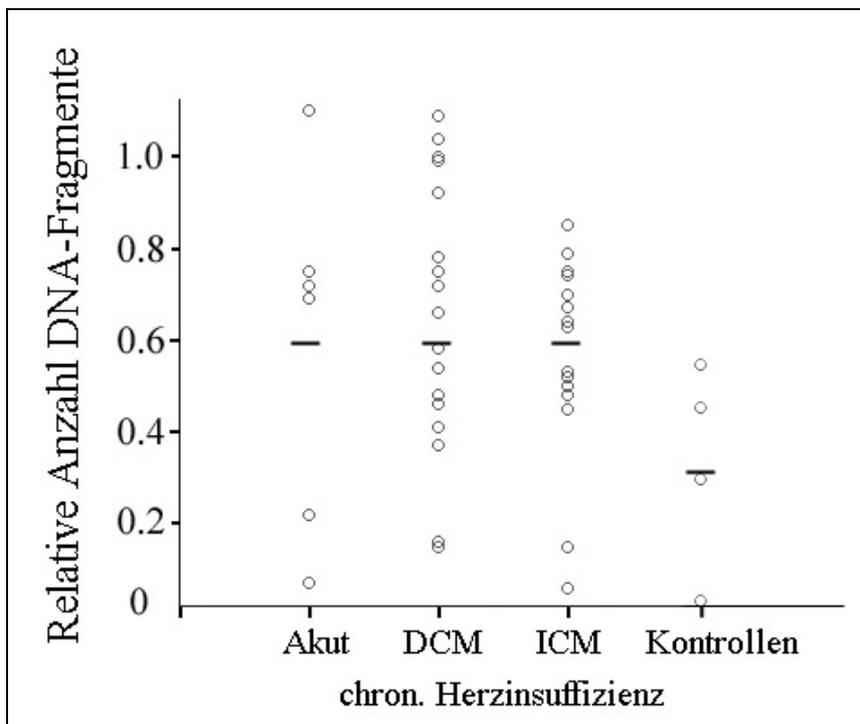


Abbildung 2

4.1.3 Fehlende Korrelation zu Hämodynamik und Medikation

Anhand der Daten können wir keine signifikante Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion auf der einen und der Caspase-3-Aktivität oder der relativen Anzahl histon-assoziierten DNA-Fragmente auf der anderen Seite nachweisen (Abbildung 3).

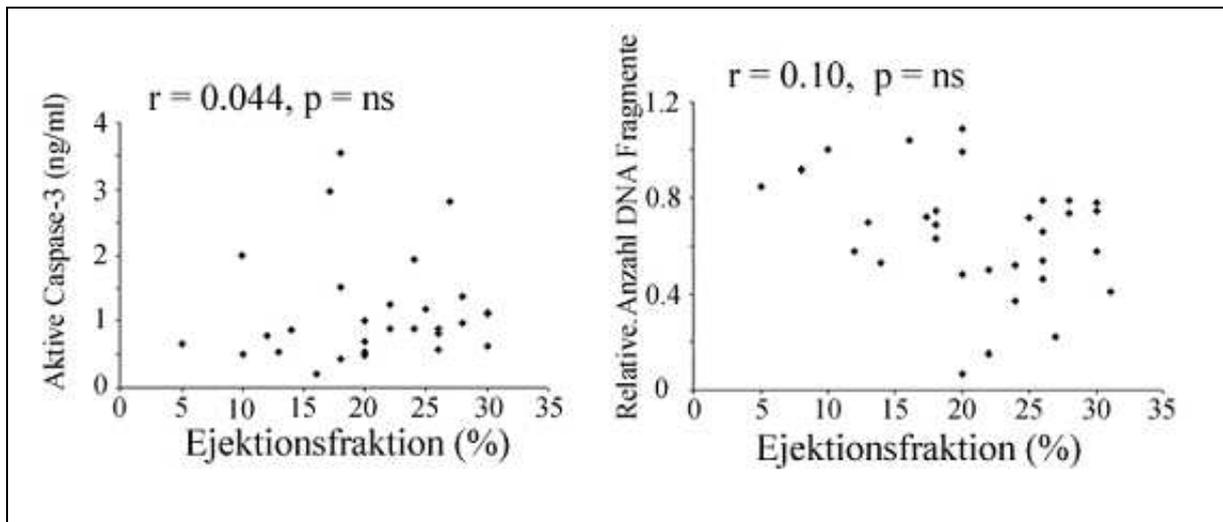


Abbildung 3

Gleiches gilt für den kardialen Index, der ebenfalls nicht mit der Caspase-3-Aktivität oder der relativen Anzahl histon-assoziiierter DNA-Fragmente signifikant korreliert (Abbildung 4).

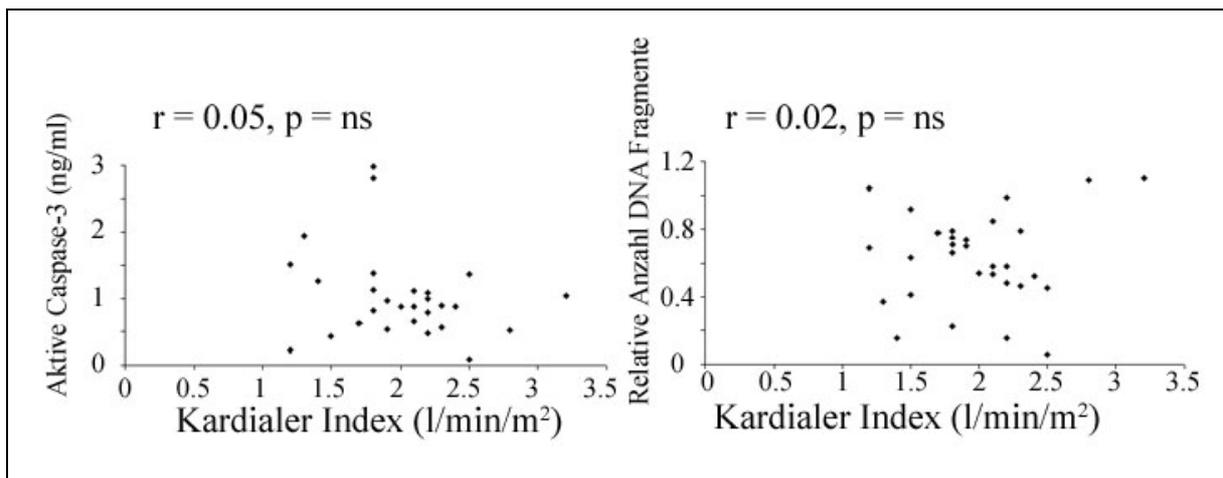


Abbildung 4

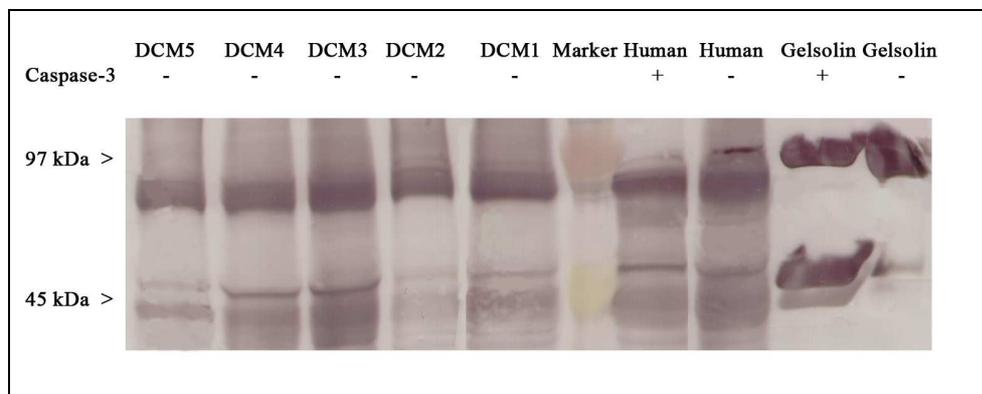
Damit lässt sich keine signifikante Korrelation der Ejektionsfraktion oder des kardialen Index zu den experimentell erhobenen Parameter nachweisen. Die weiteren hämodynamischen Parameter: fractional shortening, Herzzeitvolumen, linksatrialer, pulmonalarterieller und rechtsatrialer Druck korrelieren ebenfalls nicht mit den Caspase-Aktivitäten oder der DNA-Fragmentation (s. Tabelle 1).

Darüber hinaus übt die vor der Herztransplantation verabreichte Medikation ebenfalls weder einen Einfluss auf die Caspase-3-Aktivität noch auf die relative Anzahl histon-assoziiertes DNA-Fragmente aus (s. Tabelle 1).

4.2 Spaltung kontraktile Proteine und des Gelsolins

Wie bereits einleitend dargestellt, ist die Aktivierung der Caspase-3 durch nachfolgende organisierte Degradation essentieller zellulärer Proteine charakterisiert. Nachdem wir eine mäßige Caspase-3-Aktivierung in der humanen Herzinsuffizienz belegen können (s.4.1.1), müssen folglich auch apoptotische Proteinfragmente über Western Blot und Immunpräzipitation nachweisbar sein. Zunächst werden die myokardialen Proben auf das Vorhandensein apoptotischer Spaltprodukte des zytoplasmatisch lokalisierten Proteins Gelsolin untersucht. Dieses Protein gilt als Markerprotein für die Caspase-3-vermittelte Proteinspaltung, da es ein Substrat der aktiven Caspase-3 darstellt.

Entsprechend der durchschnittlichen mäßigen Caspase-3-Aktivierung bei den Patienten mit ICM und DCM ist mit dem Nachweis apoptotischer Spaltprodukte des Gelsolins zu rechnen. Dies lässt sich auch durch den Western Blot bestätigen, bei dem sich in der Mehrzahl aller Fälle Gelsolinspaltprodukte in den Patientenproben in unterschiedlich starker Anfärbung finden. Zur Anschaulichkeit ist nachfolgender Blot repräsentativ dargestellt:

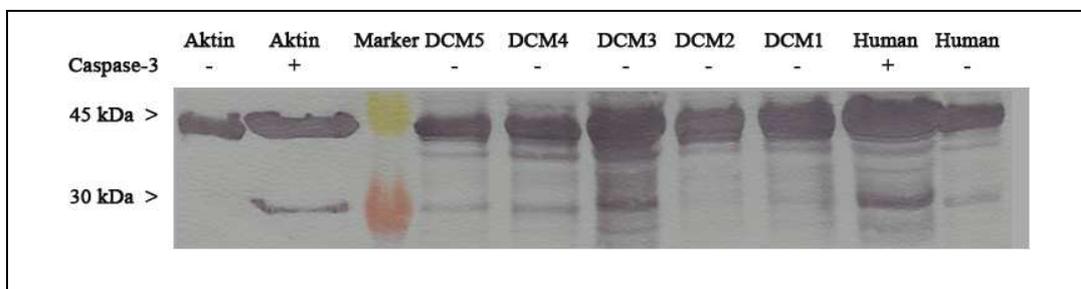


Gelsolin-Blot

Betrachtet man zunächst die beiden Gelsolinauftragungen auf der rechten Seite des Blots, so zeigen sich bei der Positivkontrolle neben dem etwa 86 kDa großen Gelsolin-Hauptprotein bei 97 kDa zwei weitere Banden auf Höhe von 45 kDa. Dabei ist eine stärker angefärbte obere Bande bei etwa 47 kDa von einer schwächer angefärbten unteren Bande bei etwa 42 kDa abgrenzbar. Diese beiden Banden sind in der nicht mit Caspase-3 inkubierten Gelsolinprobe nur schwach zu erkennen. Gleiches gilt für die beiden humanen Proben vom gleichen Patienten. Wie zu erwarten ist, stellen sich in der nativen Probenauftragung bereits die oben genannten Fragmente des Gelsolins dar. Erst durch Zugabe der aktiven Caspase-3 sind die

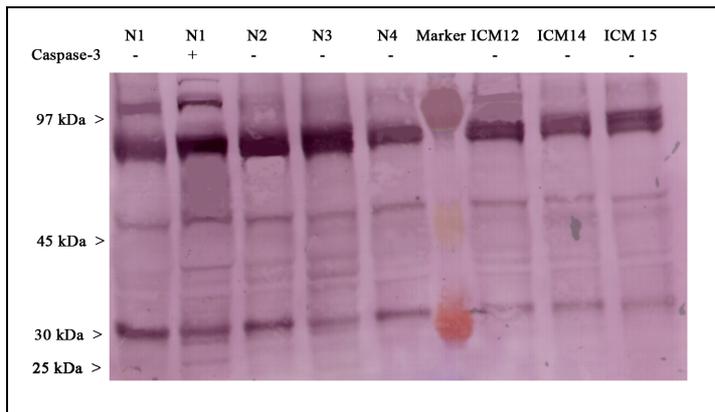
Banden deutlich kräftiger angefärbt. Betrachtet man die Patienten DCM 1, DCM 3 und DCM 4, so lassen sich bei diesen apoptosetypische Fragmente nachweisen. Bei Patientenprobe DCM 5 sind die Banden deutlich schwächer angefärbt, während Patient DCM 2 keine Spaltprodukte aufweist.

Unter der Vorstellung, dass der pathophysiologische Prozess der humanen Herzinsuffizienz durch Degradation kontraktile Proteine begünstigt wird, werden im weiteren Proteine des kontraktile Apparates der Kardiomyozyten untersucht. Dabei wird zunächst das etwa 42 kDa große Protein alpha-Aktin untersucht, welches hauptsächlich am Aufbau der dünnen Filamente des Sarkomers beteiligt ist. Anhand des repräsentativen Blots wird deutlich, dass das Protein alpha-Aktin ein Substrat der Caspase-3 darstellt, da erst nach Inkubation mit dem Enzym ein Spaltprodukt bei 30 kDa erscheint. Das Spaltprodukt ist ebenfalls abgeschwächt in der humanen Probe erkennbar, erheblich stärker wird es aber nach aktiver Caspase-3 Inkubation angefärbt. Während der Patient DCM 2 keine und der Patient DCM 1 angedeutete Spaltprodukte aufweist, werden Spaltprodukte bei den anderen drei Patienten sichtbar, am deutlichsten bei Patient DCM 3. Bei nahezu allen Patienten mit ICM und DCM kann das Spaltprodukt nachgewiesen werden.



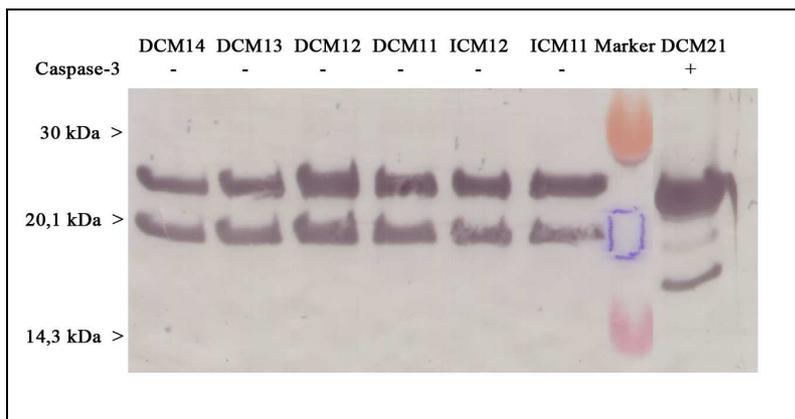
Aktin-Blot

Ebenfalls können wir die Spaltung des am Sarkomer beteiligten etwa 104 kDa großen Proteins alpha-Aktinin bei ausreichender Konzentration an aktiver Caspase-3 belegen. So zeigt nachfolgender Western Blot, dass in der mit aktiver Caspase-3 inkubierten Kontrolle N 1 im Vergleich zur nativen Kontrolle N 1 ein zusätzliches Fragment auf Höhe 25 kDa sichtbar wird. Die hier dokumentierten Patientenproben weisen jedoch keine Spaltfragmente auf. In einigen hier nicht dargestellten Patientenproben lässt sich das apoptose-typische Fragment jedoch nachweisen.



alpha-Aktinin-Blot

Das am strukturellen Aufbau des Myosins beteiligte etwa 22 kDa große Protein ventrikuläre Myosin-Leichtkette (vMLC-1) weist bei keinem Patienten apoptose-typische Fragmente auf. Allerdings lässt sich durch die Immunpräzipitation belegen, dass durch Inkubation mit aktiver Caspase-3 ein Spaltprodukt des vMLC-1 generiert wird. So sind auf dem Blot kräftige, dem ungespaltenen vMLC-1 Protein entsprechende Banden bei 20,1 kDa sichtbar. Diese Bande ist abgeschwächt auch bei der mit Caspase-3 inkubierten Probe vorhanden. Zusätzlich findet sich hier aber auch ein proteolytisches Fragment bei etwa 17 kDa.



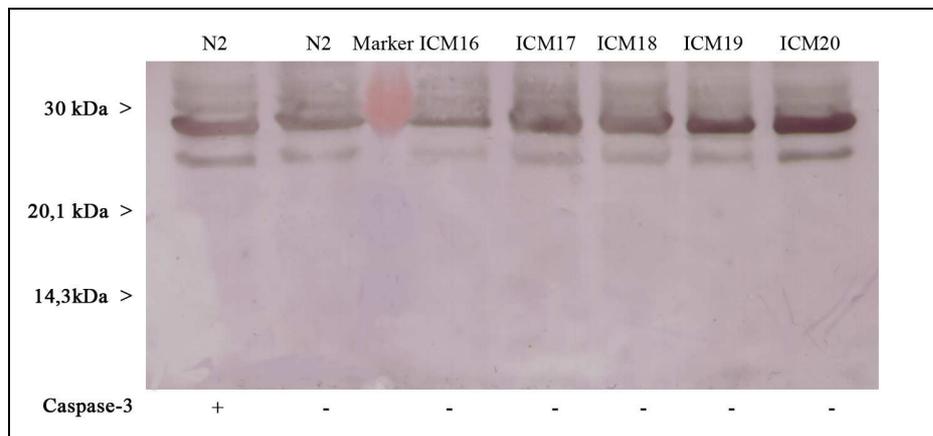
vMLC-1-Blot

Um zu überprüfen, ob eine zu geringe Sensitivität vorgelegen hat, wurde der gleiche Versuch mit einer Verdoppelung der ursprünglichen gegen das vMLC-1 Protein gerichteten Antikörpermenge und einer Proteinkonzentration von sechs an Stelle von drei Milligramm pro

Milliliter wiederholt. Doch auch dabei konnte kein proteolytisches Fragment des vMLC-1 nachgewiesen werden (Blot hier nicht gezeigt).

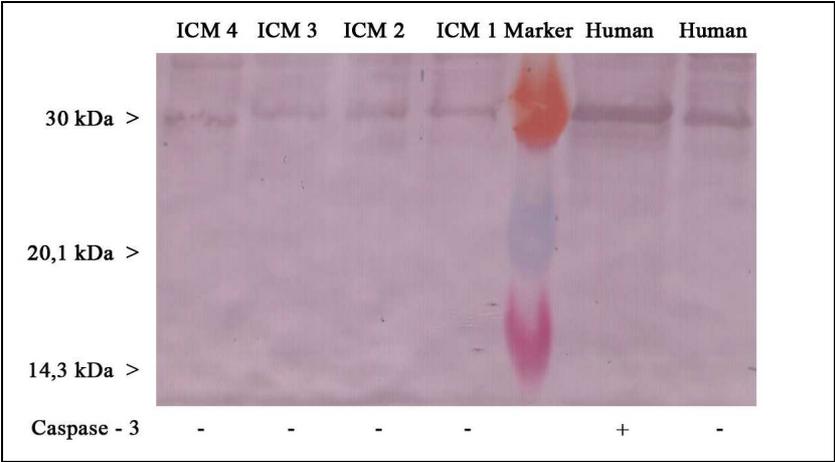
Zusammenfassend können wir zeigen, dass neben dem Protein Gelsolin die am kontraktilen Apparat beteiligten Proteine alpha-Aktin, alpha-Aktinin und vMLC-1 ein Substrat der aktiven Caspase-3 darstellen. Einen Überblick über die Ergebnisse der Immunblots findet sich in Tabelle 7 im Anhang.

Darüber hinaus wurden mit Troponin I und Tropomyosin zwei weitere Proteine des kontraktilen Apparates untersucht. Bei keinem lassen sich apoptosetypischen Spaltfragmente finden. So entspricht die untere der beiden Banden im repräsentativ dargestellten Troponin I Blot dem etwa 24 kDa großen Protein Troponin I. Weder die Caspase-inkubierte Kontrolle N 2 noch die fünf Patientenproben weisen Spaltfragmente auf.



Troponin-I-Blot

Gleiches gilt für den Blot des Proteins Tropomyosin, bei dem bis auf das etwa 33 kDa große Protein selbst keine Spaltprodukte nachgewiesen werden konnten.



Tropomyosin-Blot

5. Diskussion

5.1. Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Mit dem Begriff der Herzinsuffizienz wird allgemein ein pathophysiologischer Zustand beschrieben, bei dem das Herz bei normalem enddiastolischen Ventrikeldruck unfähig ist ein angemessenes, an die Erfordernisse des metabolisierende Gewebe ausgerichtetes Herzzeitvolumen zu fördern. Der menschliche Organismus hat jedoch adaptive Mechanismen entwickelt, um eine eingetretene akute oder chronische Herzinsuffizienz zu kompensieren. Hierzu zählt vor allem der Frank-Starling-Mechanismus, der durch eine Erhöhung des enddiastolischen Ventrikelvolumens eine physiologisch erwünschte Steigerung des Herzzeitvolumens zum Beispiel bei körperlicher Anstrengung oder in Stressreaktionen bedingt und dieser Effekt im insuffizienten Herzmuskel bis zu einem gewissen Grad ausgenutzt werden kann, um ein ausreichendes Schlagvolumen zu gewährleisten. Ein weiterer Kompensationsmechanismus stellt die generalisierte Aktivierung des sympathiko-adrenergen Systems dar, das neben einer konsekutiven Steigerung der Kontraktionskraft und Herzfrequenz eine Salz- und Wasserretention mit systemischer Vasokonstriktion über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System bewirkt und zu einer passageren Stabilisierung des arteriellen Blutdruckes in der Herzinsuffizienz führt. Während die beiden genannten Mechanismen rasch und innerhalb weniger Herzaktionen eintreten, findet als Reaktion auf eine fortwährend erhöhte enddiastolische Füllung bei der chronischen Herzinsuffizienz zusätzlich ein langsamer über Wochen bis Monate andauernder myokardialer Umbau statt. Dieses sogenannte Remodeling ist abhängig von der Art der auf den Ventrikel einwirkenden Belastung und charakterisiert durch eine Alteration in Masse, Volumen, Form und Aufbau des Herzens. Während eine Volumenbelastung des Herzens eine exzentrische Hypertrophie mit Dilatation des Ventrikels begünstigt, führt eine Druckbelastung zur konzentrischen Hypertrophie ohne Dilatation aber mit überdurchschnittlicher Zunahme der ventrikulären Wanddicke. Untersuchungen können darüber hinaus zeigen, dass die makroskopischen Veränderungen mit einer Heterogenität auf zellulärer und molekularer Ebene einhergehen (Wohlschlaeger et al. 2005).

Während die genannten Maßnahmen zunächst in der Lage sind, die kardiale Funktion aufrechtzuerhalten, kann das Herz im weiteren klinischen Verlauf die adäquate Pumpfunktion nicht mehr gewährleisten und gerät zunehmend in die Dekompensation. Als Ursache sind vor allem die anfänglich hilfreichen Kompensationsmechanismen zu nennen. Die sympathiko-

adrenerge Aktivierung führt zu einer Herabregulation der β -Rezeptoren, die Flüssigkeitsretention und Vasokonstriktion zu einer Zunahme der Nachlast und die Myokardhypertrophie ab dem kritischen Herzgewicht von etwa 500 g zu einer relativen Koronarinsuffizienz. Darüber hinaus zeigen Studien, dass in einer Vielzahl kardialer Erkrankungen wie auch der Herzinsuffizienz Kardiomyozyten in den programmierten Zelltod, auch Apoptose genannt, eintreten.

Die vorliegende Doktorarbeit hat zum Ziel, das Ausmaß der Apoptose in explantierten terminal-insuffizienten humanen Herzen an Hand festgelegter molekularer Marker mittels ELISA, Western Blot und Immunpräzipitation zu bestimmen und die Ergebnisse vor dem Hintergrund klinischer Parameter zu diskutieren.

5.2. Apoptose in Kardiomyozyten

Wie bereits einleitend erwähnt ist die Apoptose eine Form des Zelltodes und grenzt sich bereits morphologisch gegenüber anderen Formen, wie zum Beispiel der Nekrose ab.

Neben der morphologischen Darstellung geben auch histochemische und immunologische Methoden Hinweise auf den Prozess der Apoptose. Vor allem die Methode TUNEL, das heißt das durch Enzyme getriggerte Anhängen markierter Nukleotide an DNA-Enden, wird auf Grund seiner recht einfachen und guten Durchführung als Apoptosenachweis in vielen Studien verwendet.

Eine weitere Möglichkeit besteht in dem Nachweis von Caspasen. Caspasen sind Enzyme, die während der Apoptose aus Vorläuferproteinen entstehen und für die Ausübung des Zelltodes essentielle Aufgaben erfüllen. Derzeit werden in der Literatur drei verschiedene Mechanismen der Caspasenaktivierung diskutiert. Diese sollen anhand Abbildung 5 erläutert werden.

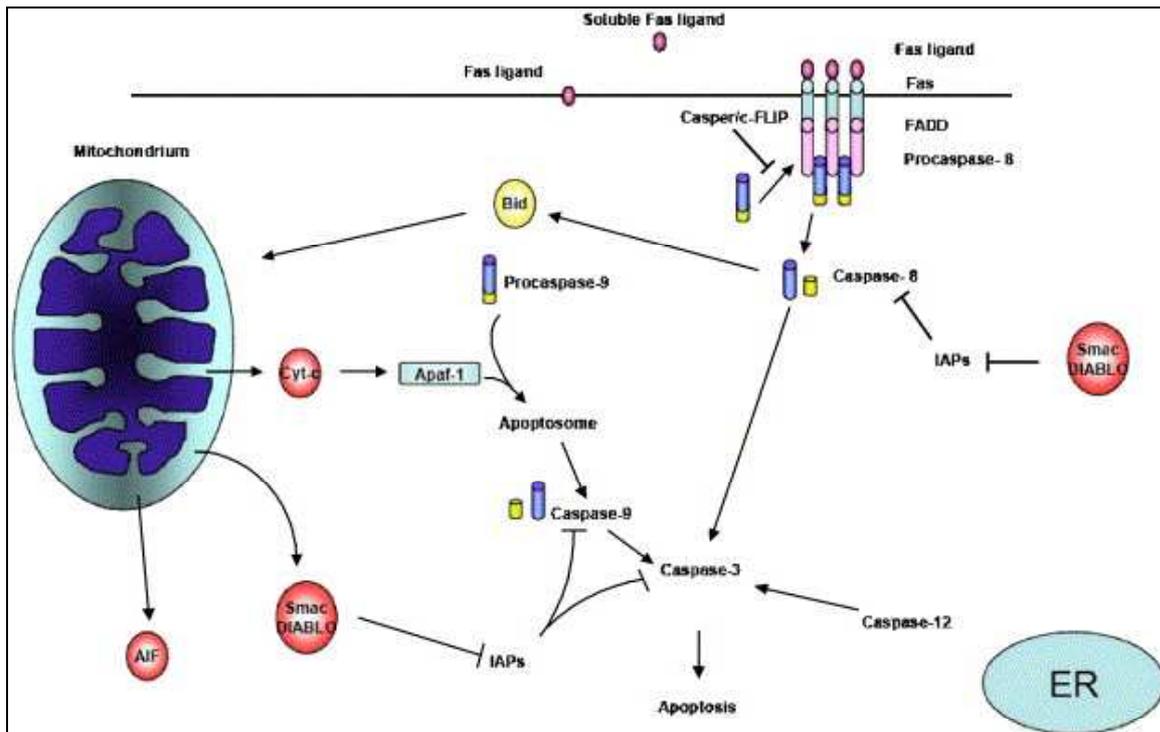


Abbildung 5

Der intrinsische oder mitochondriale Weg wird vorwiegend angestoßen durch Hypoxie, Ischämie und nachfolgende Reperfusion oder oxidativen Stress. Die Öffnung der sogenannten mitochondrial permeability transition pores, kurz MPTP oder die Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran führt zur Ausschwemmung von Cytochrom c und diversen anderen Proteinen aus dem Intermembranalspalt des Mitochondriums in alle anderen Kompartimente der Zelle. Das Cytochrom c bindet darauf hin das cytosolische Protein APAF-1 und ermöglicht damit die Bildung des sogenannten Apoptosomenkomplexes, der in Folge aus der Procaspase-9 die aktive Caspase-9 abspaltet. Letztere ist in der Lage, durch Aktivierung der Caspase-3 die weiteren apoptotischen Schritte einzuleiten. Das ebenfalls aus dem Mitochondrium freigesetzte Smac/Diablo-Protein fördert indirekt die Caspase-Aktivierung, indem es bestimmte Caspase-Inhibitoren, die IAPs (inhibitors of apoptosis proteins) blockiert (Van Empel et al. 2005).

Die extrinsische Bahn verläuft über extrazelluläre Bindung unterschiedlicher Liganden wie zum Beispiel Fas-Ligand, TNF- α und DR 3 an ihre jeweiligen Rezeptoren Fas-Rezeptor, TNF- α -Rezeptor (TNFR) und Death receptor 3. Das ist die Voraussetzung für die nachfolgende Rekrutierung entsprechender Adaptermoleküle an den Rezeptor-Ligand-Komplex. Im Fall von gebundenen Fas-Ligand an seinen Rezeptor Fas wird mit Hilfe des Adaptermoleküls FADD (Fas-associated death domain protein) eine Aktivierung der

Procaspase-8 Moleküle ermöglicht. Caspase-8 spaltet nachfolgend Procaspase-3 in seine aktive Form. Eine gesteigerte Expression des Fas-Ligand erfolgt im Anschluss an unterschiedliche pathologische Stimuli. Ebenfalls zeigen sich erhöhte Spiegel von Fas-Ligand in der Herzinsuffizienz (Van Empel et al. 2005).

Zusätzlich existiert eine dritte Möglichkeit der Caspase-3 Aktivierung. Dies geschieht über Caspase-12, ein Enzym, das im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist und bei Vorliegen bestimmter, auf das endoplasmatische Retikulum einwirkender Bedingungen freigesetzt wird (Van Empel et al. 2005).

Derzeit sind 14 Caspasen beschrieben. Während die Caspasen 2,8,9 und 10 zu den Initiatorcaspasen gerechnet werden, gehören die Caspasen 3,6 und 7 den Effektorcaspasen an (Regula et al. 2005). Die Aktivierung letztgenannter Gruppe führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer proteolytischen Spaltung von Proteinen. So wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass sowohl das cytosolische Protein Gelsolin (Kamada et al. 1998) als auch das nukleäre Protein PARP (Lazebnik et al. 1994) Substrate der Caspase-3 darstellen und an genau definierten Aminosäuresequenzen in ihre Fragmente zerlegt werden. Es ist anzunehmen, dass die Spaltung wichtiger Proteine des Zytoskeletts teilweise für die beschriebenen morphologischen Veränderungen der Zelle während der Apoptose verantwortlich ist. Generell gilt, dass der Nachweis genau charakterisierter Spaltprodukte als Indikator für die Ausführung des Apoptoseprozesses gilt.

5.3. Akute versus chronische Herzinsuffizienz

Die Effektorcaspase-3 wird für die meisten während der Apoptose generierten molekularbiologischen Veränderungen, die letztendlich zum Zelltod führen verantwortlich gemacht. Wir können zeigen, dass im Durchschnitt in allen Patientenproben eine niedrige Caspase-3-Aktivität vorliegt und die relative Anzahl histon-assoziiierter DNA-Fragmente gering ist. Jedoch weisen acht Patientenproben im Durchschnitt eine signifikant erhöhte Caspase-3-Aktivität auf. Gleichzeitig ist bei diesen acht Patienten der Anteil von histon-assoziierten DNA-Fragmenten nicht erhöht. Letztgenannte Patientenproben stammen von Herzen, die an einer akuten Herzinsuffizienz erkrankt waren. Fünf der acht an akuter Herzinsuffizienz erkrankten Patienten waren katecholaminpflichtig, während die anderen drei Patienten im Vorfeld mit einem Assist Device versorgt wurden. Bei vier Patienten ist die Ursache der

akuten Herzinsuffizienz bekannt. Ein Patient erkrankte an einer akuten viralen Myokarditis, ein anderer Patient erlitt einen akuten Myokardinfarkt in Folge einer Okklusion des linkskoronaren Hauptstamms, ein weiterer beklagte eine dekompensierte Herzinsuffizienz aufgrund einer Mitralregurgitation und der letzte Patient litt an einer dekompensierten ischämischen Kardiomyopathie.

Unsere ermittelten Ergebnisse der Caspase-3-Aktivitätsbestimmung stehen im Einklang mit der gängigen Literatur. So wird beschrieben, dass myokardiale Krankheitsbilder, die sich durch akuten Beginn und eine deutliche klinische Symptomatik auszeichnen, eine höhere Apoptoserate aufweisen. So können Apoptoseraten im Bereich von 2-12% bei Ischämie- und Reperfusionsschäden nachgewiesen werden (Ottaviani et al. 1999, Olivetti et al. 1996). Ähnlich hohe Apoptoseraten lassen sich zum einen in der Grenzzone eines humanen Myokardinfarktes nachweisen, zum anderen aber auch bei Patienten, die an akuter Myokarditis verstarben (Kyto et al. 2004). Apoptose konnte neben den bisher genannten Krankheitsbildern auch bei der arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie gezeigt werden (Mallat et al. 1996).

Dem gegenüber sind bei der chronischen Herzinsuffizienz deutlich niedrigere Apoptoseraten beschrieben. Das entspricht auch den hier ermittelten Ergebnissen, die zeigen, dass bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz nur eine durchschnittlich niedrige Caspase-3-Aktivität vorliegt. Mehrere Studien zeigen, dass in der humanen Herzinsuffizienz lediglich Apoptoseraten zwischen 80-250 Kardiomyozyten pro 10^5 Kernen vorherrschen (Olivetti et al. 1997, Saraste et al. 1999, Guerra et al. 1999). Die leichte Streuung der Apoptoseraten lässt sich damit erklären, dass sich auch bei der chronischen Herzinsuffizienz Phasen aktiver Krankheitsepisoden mit Phasen der Ruhe einander abwechseln und die Apoptoseraten im Myokardium an verschiedenen Orten zum gleichen Zeitpunkt nicht identisch sind und damit das Ergebnis auch von der Entnahmestelle der Probe aus dem explantierten Herzen abhängt. Aber selbst eine nur geringe Apoptoserate kann über mehrere Jahre dramatische Auswirkungen auf die Integrität des Myokardiums ausüben und sollte nicht unterschätzt werden. So konnte in einer erst kürzlich publizierten Studie eine nach etwa zwei Monaten eintretende letale dilatative Kardiomyopathie bereits bei Apoptoseraten um 23 Kardiomyozyten pro 10^5 Kernen bei transgenen Mäusen, die in der Lage waren, aktive Caspase-8 im Myokardium zu exprimieren, gezeigt werden (Wencker et al 2003). Damit ist die Apoptoserate etwa vier- bis zehnmal geringer als in der humanen Herzinsuffizienz und

reicht nahezu an die Apoptoseraten von gesunden humanen Herzen mit ein bis zehn apoptotischen Kardiomyozyten pro 10^5 Zellen.

Es wird diskutiert, dass die geringe Apoptoserate bei der chronischen Herzinsuffizienz mit einer Inhibition der Apoptose zusammenhängt. Gerade weil Kardiomyozyten terminal differenzierte Zellen ohne Regenerationsfähigkeit darstellen und darüber hinaus eine sehr hohe Zahl Cytochrom-c-haltiger Mitochondrien besitzen, haben sich vermutlich bestimmte Mechanismen entwickelt, um einen voranschreitenden Verlust von Zellen zu hemmen. Es ist gut vorstellbar, dass sich die Mechanismen vermehrt bei der chronischen Herzinsuffizienz wiederfinden, da bei der über mehrere Jahre verlaufenden Erkrankung dem zellulären Milieu ausreichend Zeit gegeben wird, sich auf die veränderten Bedingungen einzustellen.

Große Bedeutung kommt dabei der sogenannten Bcl-2 Familie zu, einer Vielzahl von Proteinen die entweder antagonistisch (z.B. Bcl-2, Bcl-xL) oder agonistisch (z.B. Bax, Bak) auf die Apoptose einwirken (Oltvai et al. 1993, Chittenden et al. 1995), indem sie zum Beispiel die Cytochrom-c-Freisetzung und nachfolgende Caspase-3 Aktivierung durch Stabilisieren oder Destabilisieren der mitochondrialen Membran verhindern oder fördern (Green et al. 1998). Bei insuffizienten Herzen wurde anhand mehrerer Studien eine Bcl-2 Hochregulation (Saraste et al. 1999, Olivetti et al. 1997) nachgewiesen. Gleichzeitig kann dadurch die Cytochrom-c-Freisetzung und nachfolgende Caspase-3-Aktivierung blockiert werden (Kang et al. 2000). Manche Autoren gehen so weit und behaupten, dass das Verhältnis von Bcl-2 zu Bax über das Überleben einer Zelle nach einem apoptotischen Stimulus entscheidet (Oltvai et al. 1993, Hanada et al. 1995).

Die histon-assoziierten DNA-Fragmente können ebenfalls als Nachweis stattfindender Apoptose durch Schädigung des Chromosomensatzes gelten. Typischerweise entstehen dann doppelsträngige DNA-Histon-Fragmente mit 180 bis 200 Basenpaaren bzw. ein Vielfaches dieser Länge, da die Caspase-abhängige Aktivierung der DNAsen (CAD) nur an bestimmten, internukleosomalen Regionen angreifen können (Saraste et al. 2000). Vor allem die Methode TUNEL, also das enzymatische Anhängen und damit lichtmikroskopische Kenntlichmachen modifizierter Nukleotide an DNS-Strangbrüchen mittels Tdt (Terminaldeoxynucleotid transferase) wurde in früheren Studien oftmals als Apoptosenachweis verwendet und anhand des Verhältnisses zwischen apoptotischen Kardiomyozyten und Gesamtzellzahl der sogenannte Apoptoseindex bestimmt. Die Interpretation von Ergebnissen, resultierend aus

TUNEL ist mittlerweile fragwürdig und unter Wissenschaftlern umstritten, nachdem Zweifel an der Spezifität von TUNEL bei humanen Herzen geäußert wurden. So zeigen neuere Studien, dass Kardiomyozyten auch dann TUNEL-positiv sind, wenn sich die Zelle im Wiederaufbau befindet und DNA-Schäden repariert - also im genau gegenteiligen Prozess der Apoptose (Kano et al. 1999). Manche Autoren sind der Ansicht, dass die Methode TUNEL allein nicht ausreicht, um das Vorhandensein von Apoptose während der Herzinsuffizienz zu belegen (Kang et al. 2000).

Auf Grund dieser Unklarheiten werden in der vorliegenden Arbeit die Patientenproben mit einem spezifischeren Verfahren, dem direkten Nachweis der Spaltprodukte mittels ELISA, auf das Vorhandensein von histon-assoziierten DNA-Fragmenten untersucht. Wir können zeigen, dass durchschnittlich in allen Proben nur eine geringe Anzahl histon-assoziiierter DNA-Fragmente vorliegt. Im Gegensatz zur Caspase-3-Aktivierung zeigt sich keine Erhöhung der histon-assoziierten DNA-Fragmente bei Patienten mit akuter Herzinsuffizienz. Darüber hinaus lässt sich keine Korrelation zwischen Ausmaß der Caspase-3-Aktivität und Höhe der DNA-Histon-Fragmentation herstellen.

Zusammenfassend kann daher festgestellt werden, dass in allen Proben die Caspase-3-Aktivität und die relative Anzahl histon-assoziiierter DNA-Fragmente niedrig einzustufen ist. Es fällt auf, dass in der akuten Herzinsuffizienz die Caspase-3-Aktivität signifikant erhöht ist, die Anzahl der histon-assoziierten DNA-Fragmente jedoch nicht ansteigt. Es entsteht daher der Eindruck, dass die Ausführung der Apoptose nicht unweigerlich den Nukleus der Zelle mit einschließen muss. Wenn aber die nukleäre Integrität und damit einhergehend das Genom als Träger sämtlicher Informationen einer Zelle nicht geschädigt ist, so ist es vorstellbar, dass durch Caspase degradierte Proteine neu synthetisiert werden und der Status Quo der Zelle erhalten bleibt. Dieser Sachverhalt wird in der Literatur als Reversibilität der Apoptose beschrieben. So zeigen Studien, dass trotz Caspase-3-Aktivierung in Herzen mit ischämischer und dilatativer Kardiomyopathie keine Degradation nukleärer Enzyme wie beispielsweise der Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) stattfindet (Narula et al. 1999). PARP, ein DNA-Reparaturenzym wird normalerweise als Marker für die Apoptose verwendet, da es normalerweise durch Caspasen gespalten und dadurch inaktiviert wird (Soldani et al. 2001). Die Autoren um Narula vermuten, dass sich die Kardiomyozyten in einem präapoptischen Zustand befinden, der durch die Gegenwart von Apoptosemarkern wie aktiver Caspase-3 die Bereitschaft der Zelle zur Apoptose, aber nicht den augenblicklichen Vollzug der Apoptose

anzeigt (Narula et al. 1999). Die Erkenntnis, dass einmal eingeleitete apoptotische Programme reversibel sind, der Zelltod der Kardiomyozyten nicht unweigerlich eintreten muss und die Zelle erneut zu ihrer Funktionalität zurückkehren kann, wird durch den Begriff der sogenannten „Zombie-Kardiomyozyten“ umschrieben (Narula et al. 2001).

Im klinischen Alltag lassen sich sogar Hinweise finden, dass sich nicht nur der Prozess der Apoptose in Kardiomyozyten, sondern auch die Progredienz der Herzinsuffizienz verzögern, mitunter aufhalten und sich die Funktionalität in manchen Fällen auch wieder verbessern kann. Dies konnte vor allem bei Patienten gezeigt werden, die mit einem Assist Device versorgt wurden. Es wird angenommen, dass in Folge einer niedrigeren Volumenüberlastung des Myokards nach LVAD-Implantation eine Abnahme der ventrikulären Wandspannung, eine Reduktion der Kardiomyozytenhypertrophie und ein verbesserter koronarer Fluss induziert wird und sich im besten Fall eine Wiedererlangung der ursprünglichen ventrikulären Funktion einstellt (Wohlschlaeger et al. 2005). Die Gruppe um Birks konnte bei 11 von 15 Patienten, deren LVAD zeitweise abgeschaltet wurde, eine Erholung der Pumpfunktion feststellen. Diese war so ausgeprägt, dass die LVAD bei ihnen schließlich entfernt werden konnten (Birks et al. 2006). Den gesamten Prozess bezeichnet man als „reverse remodeling“, in Abgrenzung zum eingangs erläuterten Begriff des „remodeling“, also der strukturellen und molekularen Veränderung des Herzens bei der progredienten Herzinsuffizienz, welcher sich unter anderem in einer linksventrikulären Dilatation und einer Zunahme der Wanddicke des Ventrikels äußert.

In der Literatur werden ebenfalls Veränderungen auf molekularer Ebene nach LVAD-Implantation beschrieben. So zeigt sich, dass bei zugrunde liegender dilatativer Kardiomyopathie eine Cytochrom-c Freisetzung aus dem Mitochondrium in den sarkoplasmatischen Raum von Kardiomyozyten erfolgt, während eine Cytochrom-c Ausschüttung in den sarkoplasmatischen Raum bei kardiomyopathischen Herzen einen bis 14 Monate nach LVAD-Implantation fehlt (Haider et al. 2002). Zusätzlich existieren eine Vielzahl weiterer Studien bezüglich LVAD-Implantation, die neben molekularen Mechanismen, zum Beispiel in Form von Enzym-Expressionsänderungen (Patten et al. 2005) ebenfalls einen Einfluss auf die Genregulation, beispielsweise durch Hochregulation von Apoptose-Repressorgenen nach LVAD-Implantation nachweisen (Milting et al. 1999, Bartling et al. 1999).

Anhand unserer Untersuchungen kann fallzahlbedingt nur vermutet werden, dass die Implantation eines Assist Device ebenfalls einen Einfluss auf die Apoptose ausübt. So weisen die Patienten, die mit dem LVAD mehrere Monate vorher versorgt wurden (ICM 5, DCM 16) keine erhöhten Caspase-3-Aktivitäten auf. Im Gegensatz dazu ist die Caspase-3-Aktivität bei dem Patienten, der den LVAD im Rahmen des Hauptstammverschlusses implantiert bekam deutlich erhöht. Damit das Reverse Remodeling zum Tragen kommt, muss das Assist Device wohl längere Zeit implantiert sein. Dies ist naheliegend, da der Prozess des Remodelings auch mehrere Wochen bis Monate benötigt.

Zudem wurden in dieser Arbeit die Patientenproben mittels Western Blot und Immunpräzipitation auf das Vorhandensein apoptose-typischer Fragmente untersucht.

Da wie bereits geschildert eine durchschnittliche mäßige Caspase-3-Aktivierung in den herzinsuffizienten Proben ermittelt werden konnte und Gelsolin erwiesenermaßen ein Substrat der Caspase-3 darstellt, war der Nachweis proteolytischer Fragmente des Gelsolins im Western Blot zu erwarten. Neben allen untersuchten Patienten mit akuter Herzinsuffizienz ließen sich auch bei nahezu sämtlichen Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz Spaltfragmente des Gelsolins in unterschiedlichem Ausmaß detektieren, so dass darüber die Ausführung des apoptotischen Prozesses belegt werden konnte (Sun et al. 1999).

Neuere Studien untersuchten außerdem die Auswirkung der Caspase-3-Aktivierung auf Proteine des kontraktilen Apparates von Kardiomyozyten. Sollte die Apoptose die kontraktilen Proteine mit einschließen, so wäre damit die mit der Herzinsuffizienz einhergehende Verminderung der Kontraktionskraft erklärt.

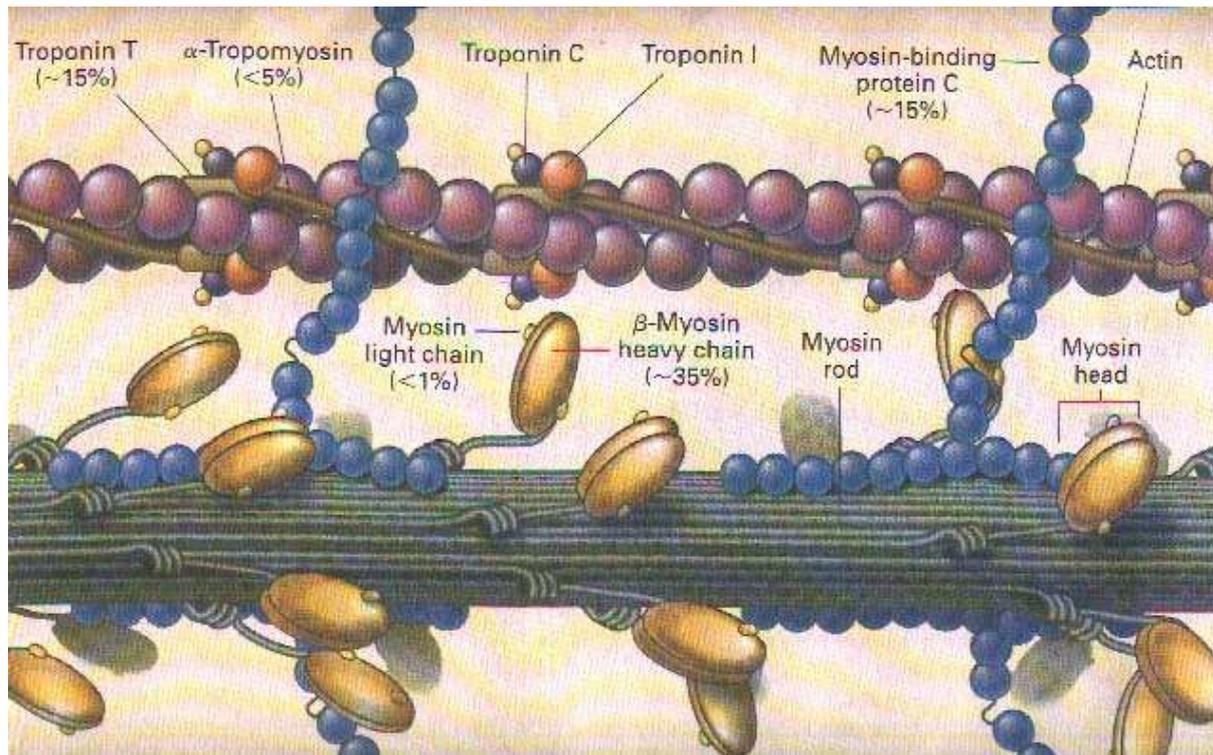


Abbildung 2

Der kontraktile Apparat ist aus zahlreichen Sarkomeren aufgebaut, wobei der Bereich zwischen zwei Z-Membranen das Sarkomer selbst darstellt. In den Z-Membranen, bestehend aus Gerüstproteinen wie zum Beispiel alpha-Aktinin, sind dünne Myofilamente verankert, die aus aneinandergereihten Aktinmolekülen aufgebaut sind und diese mit Tropomyosin und den im Troponinkomplex vereinigten Troponinen I, C und T assoziieren. Die dicken Filamente bestehen hauptsächlich aus Myosinmolekülen, Hexamere mit zwei schweren Ketten, an die jeweils zwei verschiedene leichte Ketten, eine essentielle und eine regulatorische angelagert sind. Gemäß des Gleitmodells der Muskelkontraktion (Huxley et al. 1954) wird muskuläre Kontraktion und Relaxation durch Aneinandervorbeigleiten der dünnen und dicken Filamente unter ATP-Verbrauch ermöglicht, wobei dabei die Interaktion zwischen Aktin und seinem Partner Myosin im Vordergrund steht. Die beiden leichten Ketten übernehmen gemeinsam strukturelle und regulatorische Funktionen in Bezug auf das Myosinmolekül und stabilisieren durch ihre Gegenwart den Hals des Myosinkopfes (Eden et al. 1997). Der Troponinkomplex erhält zusammen mit dem Tropomyosin seine Bedeutung in der Regulation der Aktin-Myosin-Wechselwirkung. So erfolgt im Zustand der Relaxation eine Konformationsänderung, die dazu führt, dass Tropomyosin zwischen die Aktin- und Myosinmoleküle gelangt und die Interaktion beider Partner verhindert (Daloz et al. 2001).

Eine Studie untersuchte bereits die Spaltung kontraktile Proteine *in vitro*. Dabei wurden die von unterschiedlichen Spezies gewonnenen und gereinigten Proteine α -Aktin, α -Aktinin, die schwere Myosinkette, die leichten Myosinketten 1 und 2, Tropomyosin, die kardialen Troponine T, I und C sowie der komplette Troponinkomplex der humanen rekombinanten Caspase-3 exponiert. Es zeigte sich, dass nach vierstündiger Inkubation eine Spaltung von α -Aktin und α -Aktinin erfolgte, und Troponin T nur im Troponinkomplex, aber nicht als alleiniges Protein gespalten wird. Die anderen genannten Proteine blieben von der Inkubation unbeeinflusst, darunter auch das Protein MLC-1. In weiteren Experimenten zeigten aus Ratten isolierte kardiale Myofilamente nach Apoptose-Induktion ähnliche α -Aktin und Troponin T Spaltungen (Communal et al. 2002).

In dieser Arbeit konnte in der humanen Herzinsuffizienz die Spaltung der kontraktile Proteine α -Aktin und α -Aktinin nachgewiesen werden. Eine Spaltung des Aktins ließ sich häufiger nachweisen, was eventuell daran liegen könnte, dass α -Aktinmoleküle in deutlich höheren Konzentrationen im Sarkomer der Herzmuskelzellen vorkommen als die lediglich an den Z-Membranen lokalisierten α -Aktininmoleküle. Demzufolge könnten bereits bei niedriger Caspase-3-Aktivierung über Western Blot ausreichend α -Aktin-Spaltprodukte detektierbar sein, während für den Nachweis von α -Aktinin deutlich höhere Caspase-3-Aktivitäten notwendig sind. So konnte in der Studie von Communal eine α -Aktininspaltung nur *in vitro* unter Zugabe von ausreichend Caspase-3 gezeigt werden, aber nicht in den aus Ratten isolierten kardialen Myofilamenten. Tatsächlich zeigten weitere Studien, dass α -Aktinfragmente im ischämischen Herzen von Tiermodellen sowie im Infarktgewebe beim Menschen nachweisbar sind (Ganote et al. 1987, Steenberger et al. 1987, Zhang et al. 1996), also bei Prozessen, die mit deutlich höheren Caspase-Aktivitäten einhergehen.

Beachtenswerterweise konnte in keiner Patientenprobe eine Spaltung des nur gering exprimierten vMLC-1 Proteins nachgewiesen werden. Das ist umso erstaunlicher, da mit der Immunpräzipitation ein höchst sensitives Verfahren angewendet wurde. Erst durch die externe Zugabe einer ausreichenden Menge von Caspase-3 konnte das intakte etwa 22 kDa große vMLC-1 Protein in ein bei etwa 17 kDa laufendes Fragment gespalten werden. Damit konnten wir erstmalig zeigen, dass auch das humane vMLC-1 Molekül ein Substrat der aktiven Caspase-3 darstellt.

Eine Studie der Arbeitsgruppe um Moretti konnte *in vitro* nachweisen, dass das Protein vMLC-1 durch rekombinante aktive Caspase-3 gespalten wird und dass die Degradation des Moleküls in Abhängigkeit der Enzymkonzentration erfolgt. Ebenfalls ließ sich zeigen, dass das Protein vMLC-1 ausschließlich ein Substrat der Caspase-3 darstellt und kein Substrat anderer Caspasen ist. Selbst *in vivo* konnte die vMLC-1 Spaltung registriert werden, wobei die verwendeten Proben aus Kaninchenherzen stammten, die zuvor mit einem mit hoher Frequenz eingestellten Schrittmacher dekompenzierten. Bei diesen Proben wurden sechsfach erhöhte Caspase-3-Aktivitäten festgestellt (Moretti et al. 2002). Eine Erklärung, warum ein Nachweis der Degradation des Proteins vMLC-1 *in vivo* beim Kaninchen gelang und beim Menschen nicht, könnte sein, dass beim Menschen die Tertiärstruktur des vMLC-1 gegenüber der des Kaninchens so verändert ist, dass diese gegenüber der Caspase-3 weniger empfindlich ist.

Bei den beiden weiteren am kontraktilen Apparat beteiligten Proteinen Troponin I und Tropomyosin konnten weder in den nativen noch in den mit Caspase-3 inkubierten Patientenproben Spaltfragmente festgestellt werden. Somit kann, auch unter Einbeziehung der Resultate der Gruppe von Communal davon ausgegangen werden, dass beide Moleküle keine Substrate der aktiven Caspase-3 darstellen. Darüber hinaus konnten auch keine anderen Studien eine Degradation der dünnen Filamente in der humanen Herzinsuffizienz zeigen (Van Velden et al. 2003, Knott et al. 2002).

Die Interpretation und Korrelation der Ergebnisse aus den Western Blots ist äußerst schwierig, da lediglich eine deskriptive Beschreibung möglich ist. Das Vorhandensein von Spaltprodukten erlaubt keinen Rückschluss auf hämodynamische Parameter und die aktuelle klinische Präsentation des Patienten. Das liegt unter anderem daran, dass sich beispielsweise bei der chronischen Herzinsuffizienz nur eine geringe Anzahl von Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt in dem etwa 24 Stunden andauernden apoptotischen Prozess befinden und deshalb das Ergebnis aus jeder Herzprobe nur eine Momentaufnahme darstellt und damit die Schwere einer Herzinsuffizienz zu einem bestimmten Zeitpunkt nicht widerspiegeln kann. Allein die Erkenntnis, dass die zur Pumpfunktion des Herzens erforderlichen Proteine des kontraktilen Apparates im Prozess der Apoptose beteiligt sind lässt jedoch vermuten, dass mit fortschreitender Degradation die eingangs erwähnten Kompensationsmechanismen wie Frank-Starling-Mechanismus, sympathiko-adrenerge Aktivierung oder Myokardhypertrophie unwirksam werden. Es muss daher gelingen, die Ausführung der Apoptose zu hemmen, um

darüber die kardiale Funktion aufrechtzuerhalten. Erste Untersuchungen mit insuffizienten Kaninchenherzen konnten nachweisen, dass durch die Blockade von Caspasen mit dem Pancaspase-Inhibitor p35 die Kontraktilität des Myokards verbessert werden kann (Laugwitz et al. 1999, Laugwitz et al. 2001). Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um in Zukunft neue Therapieansätze der Herzinsuffizienz zu entwickeln.

5.4 Fehlende Korrelation zu Hämodynamik und Medikation

Betrachtet man die beiden Patientenkohorten untereinander bezüglich Ausmaß der histon-assoziierten DNA-Fragmente und Caspase-3-Aktivität, so findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen ischämischer und dilatativer Kardiomyopathie. Damit deckt sich dieses Resultat mit anderen bereits publizierten Arbeiten (Olivetti et al. 1997, Narula et al. 1999), die ebenfalls zwischen beiden Entitäten bezüglich der Apoptoseraten keinen Unterschied feststellen konnten. Daher ist anzunehmen, dass die beiden Kardiomyopathien unterschiedlicher Ätiologie in einer gemeinsamen molekularen Endstrecke münden.

Ebenfalls korrelierten die hämodynamisch erhobenen Parameter wie CO, CI, PCWP, PAP, RAP, EF und FS weder zur Caspase-3-Aktivität noch zur Anzahl der histon-assoziierten DNA-Fragmente. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie der Gruppe um Okada, die in einem Viertel aller Biopsien aus Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie apoptotische Kerne mittels TUNEL nachweisen konnten. Der positive Apoptosenachweis korrelierte jedoch weder mit funktionellen Parametern wie der Ejektionsfraktion noch mit der weiteren Prognose der Krankheit (Okada et al. 2005). Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass die hier vorhandene Fallzahl zu gering ist, um Nullkorrelationen beweisen zu können. Insofern schließen die negativen Korrelationen keinesfalls aus, dass es doch einen Zusammenhang zwischen Caspase-3-Aktivität bzw. histon-assoziierten DNA-Fragmenten und den hämodynamischen Parametern gibt. Hierzu sind Untersuchungen mit deutlich mehr Patienten notwendig.

Trotz der ausführlichen Medikamentenanamnese im Vorfeld der Herztransplantation konnte eine Korrelation weder zu den hämodynamischen Parametern noch zu den experimentell ermittelten Daten gezeigt werden.

6. Zusammenfassung

Es wird angenommen, dass die Apoptose oder der programmierte Zelltod für die molekularen Veränderungen in einer Vielzahl kardialer Erkrankungen wie zum Beispiel dem Myokardinfarkt oder der Herzinsuffizienz verantwortlich ist. Die vorliegende Arbeit untersuchte das Ausmaß der Apoptose in der terminalen Herzinsuffizienz.

Hierzu wurden von 44 Patienten mit ischämischer oder dilatativer Kardiomyopathie myokardiale Proben aufbereitet. Mittels Immunblot wurde auf die Anwesenheit apoptosetypischer Spaltprodukte der Proteine alpha-Aktin, alpha-Aktinin, Troponin I, Tropomyosin, vMLC-1 und Gelsolin getestet. Um die Apoptose auch quantitativ nachzuweisen, wurde das Ausmaß der Caspase-3-Aktivierung und die Menge der histon-assoziierten DNA-Fragmente bestimmt.

Das Ausmaß der Caspase-3-Aktivierung und der DNA-Histon-Fragmentation lässt sich generell als niedrig einstufen. Es imponierte jedoch eine signifikante Steigerung der Caspase-3-Aktivität bei Patienten mit akuter Herzinsuffizienz im Vergleich zu Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz. Eine Korrelation der Caspase-3-Aktivität zu klinischen oder hämodynamischen Parametern ließ sich nicht belegen. Das gilt auch für die DNA-Histon-Fragmentation. Wir konnten außerdem zeigen, dass apoptosetypische Fragmente bei den Proteinen Gelsolin, alpha-Aktinin und alpha-Aktin, nicht jedoch bei den Proteinen Troponin I, Tropomyosin und vMLC-1 auftreten. Das Protein vMLC-1 lässt sich nur in Anwesenheit extern applizierter Caspase-3 in apoptosetypische Fragmente spalten.

Zusammenfassend konnten in den untersuchten myokardialen Proben von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz niedrige Apoptoseraten gezeigt werden, die bei Exazerbation der Herzinsuffizienz deutlich gesteigert waren. Die fehlende Korrelation experimentell erhobenen Befunde zu klinischen oder hämodynamischen Parametern kann durch die niedrige Fallzahl erklärt werden. Weitere Studien sollten in Zukunft angestrebt werden, die eine Inhibition der Apoptose und damit die Verbesserung der Herzinsuffizienz beinhalten. Dies konnte bereits am Tiermodell gezeigt werden.

7. Anhang

Tabelle 2: Patientendaten

Geschlecht	Alter	Erkrankungs- beginn	Erkrankungs- dauer	OP-Datum	Analyse- intervall	Probenort
------------	-------	------------------------	-----------------------	----------	-----------------------	-----------

Akute Herzinsuffizienz

DCM 11	W	22	2000	1	26.10.2001	4	Septum
DCM 19	M	45	2000	3	30.07.2003	2	LV
DCM 25	M	29	2000	4	11.06.2004	1	LV
DCM 21	M	51	1998	7	23.03.2005	2	LV
DCM 23	M	66	1989	16	20.05.2005	2	LV
ICM 1	M	65	1994	9	11.04.2003	2	LV
ICM 7	W	57	1998	3	16.11.2001	4	LV
ICM 16	M	57	1989	9	29.04.1998	7	Septum

Chronische Herzinsuffizienz

- dilatative Kardiomyopathie

DCM 1	M	62	1979	24	28.05.2003	2	LV
DCM 2	M	50	1998	5	21.03.2003	2	LV
DCM 3	M	25	2000	2	30.12.2002	3	LV
DCM 4	M	33	2002	0	14.12.2002	3	LV
DCM 5	W	69	1980	22	26.09.2002	3	LV
DCM 6	M	40	2002	0	15.07.2002	3	LV
DCM 7	W	14	na	na	06.06.2002	3	LV
DCM 8	W	47	1970	25	16.02.1995	10	LV
DCM 9	W	56	1993	2	13.10.1995	10	LV
DCM 10	W	33	1991	11	02.03.2002	3	LV
DCM 12	M	53	1998	3	19.01.2001	4	Septum
DCM 13	M	63	1991	8	21.12.1999	6	Septum
DCM 14	M	18	na	na	20.03.1999	6	Septum
DCM 15	M	48	1986	11	01.09.1997	8	Septum
DCM 16	M	58	1988	9	07.08.1997	8	Septum
DCM 17	M	64	1989	8	21.03.1997	8	Septum
DCM 18	M	19	2000	4	11.06.2004	1	LV
DCM 20	M	62	1993	10	18.10.2003	2	LV
DCM 22	M	53	1991	14	14.04.2005	2	LV
DCM 24	M	48	na	na	10.07.2006	1	LV

- ischämische Kardiomyopathie

ICM 2	W	52	1992	11	08.03.2003	2	LV
ICM 3	M	60	1993	9	28.10.2002	3	LV
ICM 4	M	63	1993	9	04.10.2002	3	LV
ICM 5	M	44	2002	0	15.08.2002	3	LV
ICM 6	M	45	1995	7	23.04.2002	3	LV
ICM 8	M	59	1990	11	17.09.2001	4	LV
ICM 9	M	63	1986	15	06.08.2001	4	LV
ICM 10	M	68	1993	8	06.08.2001	4	LV
ICM 11	M	66	1996	6	05.03.2002	3	Septum
ICM 12	M	62	1995	7	21.02.2002	3	Septum
ICM 14	M	54	1985	14	03.01.1999	6	Septum
ICM 15	M	60	1990	8	18.12.1998	7	Septum
ICM 17	M	60	1996	1	01.12.1997	8	Septum
ICM 18	M	64	1980	17	16.04.1997	8	Septum
ICM 19	M	60	na	na	28.06.2004	1	LV
ICM 20	M	40	na	na	29.09.2004	1	LV

Kontrollpatienten

N 1	na	54	na	na	21.11.2003	2	Septum
N 2	M	40	na	na	21.10.2003	2	Septum
N 3	M	38	na	na	14.06.2003	2	Septum
N 5	M	59	na	na	12.02.2002	3	Septum
N 6	M	46	na	na	04.04.2005	na	na

Tabelle 3: Hämodynamik

CO	CI	PAP	PCWP	RAP	SVR	PVR
[l/min]	[l/min/m2]	[mmHg]	[mmHg]	[mmHg]	[dyn*s/cm5]	[dyn*s/cm5]

Akute Herzinsuffizienz

DCM 11	2,9	na	29	25	3	na	na
DCM 19	3,2	na	28	24	14	na	na
DCM 25	na	na	40	25	14	1638	171
DCM 21	3,1	1,8	34	31	11	1263	77
DCM 23	6,1	na	na	na	na	na	na
ICM 1	6,5	3,2	21	12	5	1041	257
ICM 7	1,75	1,2	35	27	19	na	1597
ICM 16	3,2	1,8	23	12	3	1800	450

Chronische Herzinsuffizienz

- dilatative Kardiomyopathie

DCM 1	5,5	2,8	40	30	11	925	578
DCM 2	4,7	2,2	18	10	6	1055	306
DCM 3	3,9	2,1	35	27	1	1258	613
DCM 4	1,8	na	34	24	na	na	na
DCM 5	2,5	1,4	28	14	4	2310	911
DCM 6	4,4	2,3	34	25	14	1163	618
DCM 7	na	na	na	na	na	na	na
DCM 8	3,8	2	25	22	na	na	na
DCM 9	2,1	1,5	47	35	13	na	457
DCM 10	2,5	1,5	46	39	na	na	1472
DCM 12	3,5	1,7	20	12	na	na	440
DCM 13	4,1	2,2	29	20	7	na	na
DCM 14	na	na	na	na	na	na	na
DCM 15	2,6	1,2	53	45	7	na	na
DCM 16	3,1	1,8	32	25	4	na	na
DCM 17	3,6	1,8	11	4	1	1844	155
DCM 18	2,9	1,3	47	25	10	na	na
DCM 20	4,2	2,2	42	34	na	1720	150
DCM 22	6,8	3,1	22	16	9	1011	71
DCM 24	4,4	2	27	20	11	1307	127

- ischämische Kardiomyopathie

ICM 2	3,3	2,1	31	15	1	1890	751
ICM 3	2,7	1,5	51	30	17	na	533
ICM 4	4,7	2,5	23	9	5	1702	391
ICM 5	4,5	2,5	44	23	8	976	128
ICM 6	6,2	na	59	16	10	na	na
ICM 8	3,1	1,9	39	31	na	na	206
ICM 9	4,3	2,1	40	29	19	na	744
ICM 10	3,3	1,8	38	29	4	1498	933
ICM 11	4,3	2,2	40	30	11	926	741
ICM 12	na	2,4	20	9	4	na	na
ICM 14	na	na	na	na	na	na	na
ICM 15	4,1	1,9	28	25	5	1601	578
ICM 17	3,9	2,3	31	18	2	na	na
ICM 18	4,7	na	26	19	3	na	na
ICM 19	na	na	na	na	na	na	na
ICM 20	na	na	na	na	na	na	na

Kontrollpatienten

N 1	na						
N 2	na						
N 3	na						
N 5	na						
N 6	na						

Tabelle 4: Medikamenteneinnahme

Betablocker	ACE-Hemmer / AT I Blocker	Diuretikum	Amiodaron	Digitalis	Statin	Katecholamine Andere
-------------	------------------------------	------------	-----------	-----------	--------	-------------------------

Akute Herzinsuffizienz

DCM 11	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein
DCM 19	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Ja
DCM 25	na	na	na	na	na	na	Ja
DCM 21	Nein	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein	Ja
DCM 23	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein
ICM 1	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein	Ja	Ja
ICM 7	Nein	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein	Ja
ICM 16	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Nein

Chronische Herzinsuffizienz

- dilatative Kardiomyopathie

DCM 1	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Nein
DCM 2	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein
DCM 3	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein
DCM 4	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein
DCM 5	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein
DCM 6	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein
DCM 7	na	na	na	na	na	na	na
DCM 8	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein
DCM 9	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein
DCM 10	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein
DCM 12	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein
DCM 13	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein
DCM 14	na	na	na	na	na	na	na
DCM 15	Nein	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein
DCM 16	Nein	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein
DCM 17	Nein	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein
DCM 18	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein
DCM 20	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein
DCM 22	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein
DCM 24	Ja	Ja	Ja	na	na	Nein	Nein

- ischämische Kardiomyopathie

ICM 2	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein	Ja	Nein
ICM 3	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Nein
ICM 4	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein	Ja	Nein
ICM 5	Nein	Nein	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein
ICM 6	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein	Ja	Nein
ICM 8	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Nein
ICM 9	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Nein
ICM 10	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein
ICM 11	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein
ICM 12	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Nein
ICM 14	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein	Ja	na
ICM 15	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein
ICM 17	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein
ICM 18	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein
ICM 19	na	na	na	Nein	na	na	na
ICM 20	na						

Kontrollpatienten

N 1	na						
N 2	na						
N 3	na						
N 5	na						
N 6	na						

Tabelle 5: Begleiterkrankungen

	Komorbidität	Assist devices	Bemerkungen
--	--------------	----------------	-------------

Akute Herzinsuffizienz

DCM 11	MI II-III, TI II-III,	IABP	
DCM 19	na	nein	Suprarenin
DCM 25	Virusmyokarditis (Parvovirus)	nein	
DCM 21	COPD, Emphysem, Osteoporose	nein	
DCM 23	Novacorinfektion, Novacor seit 3 Mon., Niereninsuff.	Ja seit 3 Monaten	
ICM 1	BPH, Dm, HTN, HLP	nein	
ICM 7	Dm	Nein	Dobutamin
ICM 16	Hauptstammverschluss, ausged. VWI, kardiogener Schock, Novacor	Ja	

Chronische Herzinsuffizienz

- dilatative Kardiomyopathie

DCM 1	Ex-Amiodaron, ICD, VHF	Nein	
DCM 2	Gastritis, ICD bei VT	Nein	
DCM 3	Z.n. thrombotischen BAA-Verschluss	Nein	
DCM 4	VHF, Dm, HLP, Hyperurikämie, präterminale NI	Nein	
DCM 5	Dm	Nein	
DCM 6	na	Nein	
DCM 7	Z.n. CHE	Nein	
DCM 8	VHF, Z.n. cerebralen Insult, MI III, TI II	Nein	
DCM 9	Struma, MI II-III	Nein	
DCM 10	Adipositas	Nein	
DCM 12	ICD bei VT, Z.n. Ulcus ventrikuli, Z.n. Myosplint OP	Nein	
DCM 13	Komp. NI, MI II	Nein	
DCM 14	na	Nein	
DCM 15	Gastritis, komp. NI	Nein	
DCM 16	Hyperurikämie, VT	Ja (seit 5 Mon.)	
DCM 17	ICD, VHF, Struma, Nierenzyste, arrhythmogene RV-Dysplasie	Nein	
DCM 18	C2-Abusus, Ösophagitis, Gastropathie, Cholezystitis	Nein	
DCM 20	VHF	Nein	
DCM 22	Virusmyokarditis (Parvovirus)	Nein	
DCM 24	Z.n. MKR 1998 und MKE 1999, VHF	Nein	

- ischämische Kardiomyopathie

ICM 2	VHF, Hyperthyreose, NI	Nein	
ICM 3	Hypertens. Herzerkrankung, VHF, Z.n. Apoplex, Dm, Z.n. Adrenalektomie bds. bei V.a. Conn-Syndrom, RLS	Nein	
ICM 4	Nephrolithiasis, Z. n. Ulcus venticuli	Nein	
ICM 5	VHF, Z.n. Cordarex-induzierter Hyperthyreose, HLP	Ja	
ICM 6	Latente Hyperthyreose, HTN, Adipositas, VHF	Nein	
ICM 8	HLP, HTN	Nein	
ICM 9	COPD	Nein	
ICM 10	na	na	
ICM 11	Sek Dilatation, komp. NI, Dm	Nein	
ICM 12	na	na	
ICM 14	Z.n. MKR, VHF, AKS, komp. NI, Polyarthritis, pulmonale HTN	Nein	
ICM 15	HTN, HLP	Nein	
ICM 17	Dysproteinämie mit excess. Lp(a) Erhöhung, Lipidapherese	Nein	
ICM 18	Nikotinabusus	Nein	
ICM 19	COPD, Dm, Z.n MKE	Nein	
ICM 20	VHF, Insync-SM, Hyperthyreose, Dm	Nein	

Kontrollpatienten

N 1	ICB, Koronarsklerose RCA	Nein	
N 2	Hirnödem, Koronarsklerose	Nein	
N 3	SAB, Koronarsklerose	Nein	
N 5	na	Nein	
N 6	Subarachnoidalblutung, Koronarsklerose	na	

Tabelle 6: ELISA-Daten

Caspase-3 [ng/ml]	DNA- Fragmente
----------------------	-------------------

Akute Herzinsuffizienz

DCM 11	1,17	0,72
DCM 19	0,69	0,07
DCM DHZ 1	3,55	0,75
DCM 21	3,00	0,72
DCM 23	2,00	na
ICM 1	1,04	1,1
ICM 7	1,51	0,69
ICM 16	2,81	0,22

Chronische Herzinsuffizienz

- dilatative Kardiomyopathie

DCM 1	0,52	1,09
DCM 2	1,00	0,48
DCM 3	1,12	0,58
DCM 4	0,50	1
DCM 5	1,26	0,15
DCM 6	0,56	0,46
DCM 7	1,95	0,54
DCM 8	0,88	0,54
DCM 9	na	0,92
DCM 10	na	0,41
DCM 12	0,62	0,78
DCM 13	0,78	0,58
DCM 14	1,41	0,16
DCM 15	0,22	1,04
DCM 16	0,81	0,66
DCM 17	1,13	0,75
DCM 18	1,95	0,37
DCM 20	0,48	0,99
DCM 22	2,34	na
DCM 24	2,50	na

- ischämische Kardiomyopathie

ICM 2	0,65	0,85
ICM 3	0,43	0,63
ICM 4	1,36	0,45
ICM 5	0,09	0,06
ICM 6	1,05	0,48
ICM 8	0,96	0,74
ICM 9	0,87	0,53
ICM 10	1,38	0,79
ICM 11	1,09	0,15
ICM 12	0,88	0,52
ICM 14	0,48	0,67
ICM 15	0,54	0,7
ICM 17	0,89	0,79
ICM 18	0,88	0,5
ICM 19	0,97	0,64
ICM 20	0,72	0,75

Kontrollpatienten

N 1	1,28	0,57
N 2	1,41	0,27
N 3	1,01	0
N 5	1,31	0,46
N 6	1,1	na

Tabelle 7: Blot-Daten

vMLC-1	Aktin	Gelsolin	Troponin I	Tropomyosin	alpha-Actinin
--------	-------	----------	------------	-------------	---------------

Akute Herzinsuffizienz

DCM 11	-	+	+	-	-	-
DCM 19	-	+	(+)	-	-	(+)
DCM DHZ 1	na	na	na	na	na	na
DCM 21	-	+	(+)	-	-	-
DCM 23	na	na	na	na	na	na
ICM 1	-	+	+	-	-	+
ICM 7	-	-	+	-	-	-
ICM 16	-	+	+	-	-	-

Chronische Herzinsuffizienz

- dilatative Kardiomyopathie

DCM 1	-	(+)	+	-	-	+
DCM 2	-	-	-	-	-	-
DCM 3	-	+	+	-	-	-
DCM 4	-	+	+	-	-	+
DCM 5	-	+	(+)	-	-	+
DCM 6	-	+	+	-	-	+
DCM 7	-	-	-	-	-	-
DCM 8	-	+	+	-	-	-
DCM 9	-	+	+	-	-	+
DCM 10	-	(+)	(+)	-	-	+
DCM 12	-	+	+	-	-	-
DCM 13	-	+	(+)	-	-	-
DCM 14	-	+	(+)	-	-	(+)
DCM 15	-	+	(+)	-	-	-
DCM 16	-	+	+	-	-	-
DCM 17	-	+	+	-	-	(+)
DCM 18	-	+	(+)	-	-	(+)
DCM 20	-	+	+	-	-	-
DCM 22	na	na	na	na	na	na
DCM 24	na	na	na	na	na	na

- ischämische Kardiomyopathie

ICM 2	-	+	+	-	-	+
ICM 3	-	(+)	+	-	-	+
ICM 4	-	+	+	-	-	+
ICM 5	-	-	-	-	-	(+)
ICM 6	-	(+)	+	-	-	+
ICM 8	-	(+)	+	-	-	-
ICM 9	-	(+)	+	-	-	+
ICM 10	-	+	+	-	-	-
ICM 11	-	+	?	-	-	-
ICM 12	-	+	?	-	-	-
ICM 14	-	+	-	-	-	-
ICM 15	-	+	?	-	-	-
ICM 17	-	+	-	-	-	(+)
ICM 18	-	+	(+)	-	-	-
ICM 19	-	+	-	-	-	(+)
ICM 20	-	+	-	-	-	-

Kontrollpatienten

N 1	-	(+)	+	-	-	?
N 2	-	-	-	-	-	?
N 3	-	+	+	-	-	?
N 5	-	+	(+)	-	-	?
N 6	na	na	na	na	na	na

Tabelle 8: Geräte, Verbrauchsmaterialien und Hilfsgegenstände

Verbrauchsmaterialien und Hilfsgegenstände:

Cell Death Detection ELISA plus	Roche, Mannheim
Eisbad klein, 1-6031	Neolab, Heidelberg
Mikrotiterplatte	Becton Dickinson, Heidelberg
Mini-Protean Tetra Electrophoresis System	Bio-Rad, München
Mini-Trans-Blot Cell	Bio-Rad, München
Nitrocellulose membran filter, Hybond C	Amersham, Freiburg
Opti 4CN Substrate Kit	Bio-Rad, München
Pipetten- und spitzen von 0,1 bis 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Powder free latex exam gloves	Kimberly Clark
PowerPac 300	Bio-Rad, München
Protein Assay	Bio-Rad, München
Quantikine human active caspase-3	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
Reagenzröhren 10ml, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Surgical disposable blade-scalpel	Feather, Osaka
Western Blot Amplification module	Bio-Rad, München

Geräte

Heizgerät (Thermoblock Biotherm BT-11)	IDL
Schüttler Swip SM 25	Edmund Bühler, Deutschland
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach
Messwaage LC 620 D	Sartorius, Göttingen
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 30 RF universal	Hettich, Tuttlingen
Photometer	Becton Dickinson, Heidelberg
Über-Kopf-Rotator	Eigenanfertigung
Ultra Turrax	IKA Labortechnik, Staufen
Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Schüttelgerät Reax top	Heidolph, Schwabach

Tabelle 9: Chemikalien, Proteine und Lösungen

Chemikalien:

Acrylamid/Bisacrylamid	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
BSA	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Sigma, Deisenhofen
DTT	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Apotheke, RdI München
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Sigma, Deisenhofen
HCl	Merck, Darmstadt
Hepes	Invitrogen, Karlsruhe
Iodoacetamide	Sigma, Deisenhofen
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Bio Rad, München
Methanol	Merck, Darmstadt
Na-Azid	Merck, Darmstadt
NaCl	Sigma, Deisenhofen
Pepstatin	Sigma, Deisenhofen
PMSF	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
Proteaseinhibitorcocktail	Sigma, Deisenhofen
Protein G Sepharose	Sigma, Deisenhofen
Rainbowmarker RPN 756	Amersham, Freiburg
SDS	Sigma, Deisenhofen
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tris	Sigma, Deisenhofen
Triton X	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Sigma, Deisenhofen

Proteine:

Primärantikörper:

Name des Antikörpers	Hersteller
Monoclonal Anti- α -sarcomeric Actin Clone 5C5	Sigma, Deisenhofen
Monoclonal Anti- α Actinin Clone EA-53	Sigma, Deisenhofen
Mouse Anti-Gelsolin Monoclonal ab	RDI, Flanders
Tropomyosin Ab-2 (Clone CH291)	NeoMarkers, Westinghouse, USA
Troponin I (H170) Antibody	Santa Cruz, Heidelberg
Purified 2C8 human MLC-1 mouse monoclonal ab (Anti-MLC-1)	BiosPacific, Emeryville

Sekundärantikörper:

Name des Antikörpers	Hersteller
Anti-mouse-IgG-Peroxidase	SIGMA, Deisenhofen
Anti-rabbit-IgG-Peroxidase	SIGMA, Deisenhofen

Lösungen:

Myokard-Probenauf- bereitung	Reaktionsbeschleuniger	1 μ l 1 mM DDT 100 μ l nicht denaturierender Puffer
SDS-Elektrophorese	SDS-Laufpuffer 1x	100 ml SDS-Laufpuffer 10x 900 ml dest. H ₂ O
SDS-Elektrophorese	SDS-Laufpuffer 10x	30,3 g Tris Base 141,1 g Glycin pH=8,3 mit HCl einstellen 100 ml SDS 10% auf 1000 ml mit dest. H ₂ O auffüllen
SDS-Elektrophorese	SDS-Probenpuffer 6x	7 ml 0,5 M Tris-HCl, pH=6,8

	Lämmli-puffer	3 ml Glycerol 1 g SDS 0,93 g DTT 1,2 mg Bromphenolblau auf 10 ml mit dest. H ₂ O auffüllen
SDS-Elektrophorese	Sammelgelpuffer	6,1 ml dest. H ₂ O 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH=6,8 100 µl SDS 10% 1,3 ml Acrylamid/Bisacrylamid 50 µl APS 20 µl TEMED
SDS-Elektrophorese	Trenngelpuffer, 12%ig	3,35 ml dest. H ₂ O 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH=8,8 100 µl SDS 10% 4 ml Acrylamid/Bisacrylamid 50 µl APS 10 µl TEMED
SDS-Elektrophorese	Trenngelpuffer, 15%ig	2,35 ml dest. H ₂ O 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH=8,8 100 µl SDS 10% 5 ml Acrylamid/Bisacrylamid 50 µl APS 10 µl TEMED
Western Blot	Western Blot Puffer	115,2 g Glycin 24,2 g Tris Base 5 ml SDS 10% Methanol 1000 ml auf 5000 ml mit dest. H ₂ O auffüllen
Western Blot	TBS	8,8 g/l NaCl 10 ml 1 M Tris HCl, pH=8,0 auf 1000 ml mit H ₂ O auffüllen
Western Blot	TBST	s. TBS + 0,5 ml Tween 20
Western Blot	Verdünnung für primären Antikörper	0,1% BSA

	Antikörper	0,02% Na-Azid TBS
Western Blot	PBST 10x	990 ml H ₂ O 20 ml Tween 20
Western Blot	PBST 1x	100 ml PBST 10x (= 900 ml H ₂ O)
Western Blot	BAR-Lösung	10 ml Amplification diluent 5 ml 4x BAR 5 ml dest. H ₂ O
Western Blot	Streptavidin-HRP Stammlösung	20 µl Streptavidin-HRP Stammlösung 0,2 g BSA auf 20 ml mit PBST verdünnen
Western Blot	Opti 4CN Substratlösung	1 ml Opti 4CN Diluent 0,2 ml Opti 4CN Substrat 9 ml dest. H ₂ O
Western Blot	Magermilchlösung 5%	10 g Magermilchpulver 200 ml TBST
Immunpräzipitation	Sepharose-G-Lösung	30 µl Sepharose G (50% in PBS) 0,5 ml PBS + 0,01% Triton X
Immunpräzipitation	Nicht denaturierende Pufferlösung	20 ml nicht denaturierender Puffer 37 mg Iodoacetamid 200 µl PMSF 40 µl Leupeptin 500
Human active Caspase-3 ELISA	Streptavidin-HRP Stammlösung	0,5 ml Conjugate Concentrate 11 ml Conjugate diluent
Human active Caspase-3 ELISA	Aktiver Caspase-3 Standard	40 ng active Caspase-3 Standard 2 ml Pufferlösung
Human active Caspase-3 ELISA	Biotinylierter Caspase-Inhibitor	400 µg biotinylated ZVKD-fmk inhibitor 92 µl DMSO
Human active Caspase-3 ELISA	Pufferlösung	20 ml Calibrator diluent RD5-20 Concen. 80 ml dest. H ₂ O
Human active Caspase-3 ELISA	Waschpuffer	20 ml Wash Buffer Concentrate 480 ml dest. H ₂ O

Human active Caspase-3 ELISA	Substratlösung	Color Reagent A und Color Reagent B gemischt mit jeweils gleichem Volumen
Human active Caspase-3 ELISA	Blockadelösung	23 ml of diluted HCl
Cell Death Detection ELISA	Immunreagenzlösung	200 µl Anti-histone-Biotin 200 µl Anti-DNA-POD 3600 µl Incubation buffer
Cell Death Detection ELISA	Inkubationspuffer	Incubation buffer
Cell Death Detection ELISA	Substratlösung ABTS	3 Tablets ABTS substrate tablet 15 ml Substrate buffer

8. Abkürzungen

°C	Grad Celcius
Anti-MLC-1	Antikörper gegen die Myosin-Leichtkette-1
AKS	Aortenklappenstenose
APS	Ammoniumpersulfat
BAA	Bauchaortenaneurysma
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
BSA	Bovines Serum-Albumin
C2	Alkohol
CHE	Cholezystektomie
CO	Cardiac Output
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CI	Cardiac Index
Da	Dalton
Dest. H ₂ O	Destilliertes Wasser
Dm	Diabetes mellitus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Ejektionsfraktion
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FS	Fractional Shortening
g	Gewichtskraft
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HLP	Hyperlipoproteinämie
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
HTN	Arterielle Hypertonie
IABP	Intra-aortale Ballongegenpulsation
ICB	intrakranielle Blutung
ICD	Implantierbarer Cardioverter Defibrillator
ICM	Ischämische Kardiomyopathie
kDa	Kilodalton
LVAD	Left ventricular assist device

mA	Milliampère
mg	Milligramm
MI	Mitralinsuffizienz
MKR	Mitralklappenrekonstruktion
MKE	Mitralklappenersatz
ml	Milliliter
Na-Azid	Natriumacid
NaCl	Kochsalz
NI	Niereninsuffizienz
na	nicht aufgeführt
ng	Nanogramm
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
PAP	Pulmonary artery pressure
PBS	Phosphate-buffered saline
PBST	PBS containing TWEEN
PCWP	Linksatrialer Druck
PMSF	Phenylmethanesulphonylfluorid
PVR	Pulmonary vascular resistance
RAP	Right atrial pressure
RCA	Rechte Koronararterie
RLS	Restless-legs-Syndrom
rpm	Rotations per minute
RV	rechter Ventrikel
SAB	Subarachnoidalblutung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SM	Schrittmacher
SVR	Systemic vascular resistance
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TBS	Tris-buffered saline
TBST	TBS containing TWEEN
TI	Trikuspidalinsuffizienz
Tris	Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan

Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat
V.a.	Verdacht auf
VHF	Vorhofflimmern
VT	Ventrikuläre Tachykardie
vMLC-1	Myosin-Leichtkette-1, ventrikuläre Isoform
VWI	Vorderwandinfarkt
Z.n.	Zustand nach

9. Literaturverzeichnis

Anversa P, Li P, Zhang X, Olivetti G, Capasso JM: Ischaemic myocardial injury and ventricular remodelling. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 145 – 157.

Bartling B, Milting H, Schumann H, Darmer D, Arusoglu L, Koerner MM, El-Banayosy A, Koerfer R, Holtz J, Zerkowski HR. Myocardial gene expression of regulators of myocyte apoptosis and myocyte calcium homeostasis during hemodynamic unloading by ventricular assist devices in patients with end-stage heart failure. *Circulation*. 1999; 100: II216 - 23.

Beltrami CA, Finato N, Rocco M, Feruglio GA, Puricelli C, Cigola E, Sonnenblick EH, Olivetti G, Anversa P: The cellular basis of dilated cardiomyopathy in humans. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 291 – 305.

Bing OH: Hypothesis: apoptosis may be a mechanism for the transition to heart failure with chronic pressure overload. *J Mol Cell Cardiol* 1994; 26: 943 – 948.

Birks EJ, Tansley PD, Hardy J, George RS, Bowles CT, Burke M, Banner NR, Khagani A, Yacoub MH: Left ventricular assist device and drug therapy for the reversal of heart failure. *NEJM* 2006; 355: 1873-1884.

Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI, Guild BC. Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 1995; 374: 733 - 736.

Cohn NJ, Tognoni G, the Valsartan Heart Failure Trial Investigators: A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. *N Engl J Med* 2001; 345: 1667 – 1675.

Communal C, Sumandea M, De Tombe P, Narula J, Solaro RJ, Hajjar RJ: Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6252-6256.

Dalloz F, Osinska H, Robbins J: Manipulating the contractile apparatus: genetically defined animal models of cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 9 – 25.

Eden D, Highsmith S: Light – chain – dependent myosin structural dynamics in solution investigated by transient electrical birefringence. *Biophys J* 1997; 73: 952 – 958.

Ganote CE, Vander Heide RS: Cytoskeletal lesions in anoxic myocardial injury. A conventional and high-voltage electron-microscopic and immunofluorescence study. *Am J Pathol* 1987; 129: 327 – 344.

Green DR, Reed JC: Mitochondria and Apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309 – 1312.

Guerra S, Leri A, Wang X, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Kajstura J, Anversa P. Myocyte death in the failing human heart is gender dependent. *Circ Res* 1999; 85: 856 – 866.

Haider N, Narula N, Narula J: Apoptosis in heart failure represents programmed cell survival, not death, of cardiomyocytes and likelihood of reverse remodeling. *J Card Fail* 2002; 8 (6 Suppl): S512-517.

Hanada M, Aime-Sempe C, Sato T, Reed JC. Structure-function analysis of Bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax. *J Biol Chem.* 1995; 270: 11962 - 11969.

Huxley H, Hanson J: Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* 1954; 173: 973-976.

Kamada S, Kusano H, Fujita H, Ohtsu M, Koya RC, Kuzumaki N, Tsujimoto Y: A cloning method for caspase substrates that uses the yeast two-hybrid system: cloning of the antiapoptotic gene gelsolin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8532-7.

Kang PM, Haunstetter A, Aoki H, Usheva A, Izumo S: Morphological and molecular characterization of adult cardiomyocyte apoptosis during hypoxia and reoxygenation. *Circ Res* 2000; 87: 118-125.

Kang PM, Izumo S. Apoptosis and heart failure: A critical review of the literature. *Circ Res.* 2000; 86:1107 - 13.

Kanoh M, Takemura G, Misao J, Hayakawa Y, Aoyama T, Nishigaki K, Noda T, Fujiwara T, Fukuda K, Minatoguchi S, Fujiwara H: Significance of Myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy - not Apoptosis but DNA repair. *Circulation* 1999; 99: 2757 – 2764.

Knaapen MW, Davies MJ, De Bie M, Haven AJ, Martinet W, Kockx MM: Apoptotic versus autophagic cell death in heart failure. *Cardiovasc Res* 2001; 51: 304-312.

Knott A, Purcell I, Marston S. In vitro motility analysis of thin filaments from failing and non-failing human heart: troponin from failing human hearts induces slower filament sliding and higher Ca(2+) sensitivity. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 469 – 82.

Kostin S, Pool L, Elsässer A, Hein S, Drexler HC, Arnon E, Hayakawa Y, Zimmermann R, Bauer E, Klövekorn WP, Schlaper J: Myocytes die by multiple mechanism in failing human hearts. *Circ Res* 2003; 92: 715-724.

Kytö V, Saraste A, Saukko P, Henn V, Pulkki K, Vuorinen T, Voipio-Pulkki LM: Apoptotic cardiomyocyte death in fatal myocarditis. *Am J Cardiol* 2004; 94: 746-750.

Laugwitz KL, Moretti A, Weig HJ, Gillitzer A, Pinkernell K, Ott T, Pragst I, Stadele C, Seyfarth M, Schomig A, Ungerer M: Blocking caspase-activated apoptosis improves contractility in failing myocardium. *Hum Gene Ther* 2001; 12(17): 2051 – 2063.

Laugwitz KL, Ungerer M, Schöneberg T, Weig HJ, Kronsbein K, Moretti A, Hoffmann K, Seyfarth M, Schultz G, Schömig A: Adenoviral gene transfer of the human V2 vasopressin receptor improves contractile force of rat cardiomyocytes. *Circulation* 1999; 99: 925 – 933.

Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC: Cleavage of poly(ADP – ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 1994; 371: 346 – 347.

Mallat Z, Tedgui A, Fontaliran F, Frank R, Durigon M, Fontaine G: Evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *N Engl J Med* 1996; 335: 1190-1196.

Mc Murray JJ, Stewart S. Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 2000; 83: 596-602.

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

Moretti A, Weig HJ, Ott T, Seyfarth M, Holthoff HP, Grewe D, Gillitzer A, Bott-Flügel L, Schömig A, Ungerer M, Laugwitz KL: Essential myosin light chain as a target for caspase-3 in failing myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 11860-11865.

Narula J, Arbustini E, Chandrashekar Y, Schwaiger M. Apoptosis and the systolic dysfunction in congestive heart failure. Story of apoptosis interruptus and zombie myocytes. *Cardiol Clin* 2001; 19:113 – 26.

Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA: Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 1996; 335: 1182-1189.

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

Okada H, Takemura G, Koda M, Kanoh M, Kawase J, Minatoguchi S, Fujiwara H: Myocardial apoptotic index based on in situ DNA nick end-labeling biopsies does not predict prognosis of dilated cardiomyopathy. *Chest* 2005; 128: 1060-1062.

Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P: Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997; 336: 1131-1141.

Olivetti G, Quaini F, Sala R, Lagrasta C, Corradi D, Bonacina E, Gambert SR, Cigola E, Anversa P. Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of

programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 2005 - 2016.

Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609 – 619.

Ottaviani G, Lavezzi AM, Rossi L, Matturri L. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and apoptosis in hyperacute and acute myocardial infarction. *Eur J Histochem* 1999; 43: 7 – 14.

Patten RD, DeNofrio D, El-Zaru M, Kakkar R, Saunders J, Celestin F, Warner K, Rastegar H, Khabbaz KR, Udelson JE, Konstam MA, Karas RH: Ventricular assist device therapy normalizes inducible nitric oxide synthase expression and reduces cardiomyocyte apoptosis in the failing human heart. *J Am Coll Card* 2005; 45: 1419-1424.

Saraste A, Pulkki K: Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 528-537.

Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Heikkilä P, Laine P, Mattila S, Nieminen MS, Parvinen M, Voipio-Pullki LM: Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation. *Eur J Clin Invest* 1999; 29 (5): 380-386.

Soldani C, Lazze MC, Bottone MG, Tognon G, Biggiogera M, Pellicciari CE, Scovassi I: Poly(ADP-ribose) polymerase cleavage during apoptosis: when and where? *Experimental Cell Research* 2001; 269: 193-201.

Steenbergen C, Hill ML, Jennings RB: Cytoskeletal damage during myocardial ischemia: changes in vinculin immunofluorescence staining during total in vitro ischemia in canine heart. *Circ Res* 1987 ; 60: 478 - 86.

Sun HQ, Yamamoto M, Mejillano M, Yin HL: Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J Biol Chem* 1999; 274: 33179-33182.

Van der Velden J, Papp Z, Zaremba R, Boontje NM, de Jong JW, Owen VJ, Burton PB, Goldmann P, Jaquet K, Stienen GJ: Increased Ca²⁺-sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc Res* 2003; 57(1):37 - 47.

Van Empel VP, Bertrand AT, Hofstra L, Crijns HJ, Doevendans PA, De Windt LJ: Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovasc Res* 2005; 67: 21-29.

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

Wohlschlaeger J, Schmitz KJ, Schmid C, Schmid KW, Keul P, Takeda A, Weis S, Levkau B, Baba HA: Reverse remodeling following insertion of left ventricular assist devices (LVAD): A review of the morphological and molecular changes. *Cardiovasc Res* 2005; 68: 376-386.

Zhang JM, Riddick L: Cytoskeleton immunohistochemical study of early ischemic myocardium. *Forensic Sci Int* 1996; 80: 229 – 238.

10. Eigene Veröffentlichung

Bott-Flügel L, Weig HJ, Ühlein H, Näbauer M, Laugwitz KL, Seyfarth M: Quantitative analysis of apoptotic markers in human end-stage heart failure. Eur J Heart Fail 2008; 10: 129-132.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, ohne die die Erstellung der Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre. Im einzelnen möchte ich danken:

- Herr Prof. Dr. med. M. Seyfarth für die freundliche Überlassung des Themas. Er hatte stets ein offenes Ohr und unterstützte die Arbeit nicht nur bei den sehr konstruktiven wöchentlichen Labortreffen, sondern auch darüber hinaus.
- Besonderer Dank gebührt meinem Betreuer Herrn Dr. med. Lorenz Bott-Flügel für die tatkräftige Unterstützung und anregenden Diskussionen. Er war jederzeit für mich ansprechbar und half mir auch in schwierigen Situationen weiter.
- Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Seyfarth, insbesondere Frau Diana Grewe, die durch ihre Hilfe ein Gelingen der Arbeit erst möglich gemacht haben.
- Meiner Familie, Katrin und Julian, die vor allem in der experimentellen Phase der Arbeit sehr tolerant waren und mir bei der schriftlichen Ausfertigung den notwendigen Freiraum gewährten.