

**Die Wirkung des Apoptose-hemmenden Proteins p35  
auf die Hämodynamik und die Infarktgröße im Herzinfarktmodell an der Ratte**

Martina Daniela Knödler



Aus der  
I. Medizinischen Klinik der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. A. Schömig)  
und aus dem  
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung  
Arbeitsgruppe Experimentelle Chirurgie  
der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher)

Angefertigt unter der Leitung von  
PD Dr. med. M. Seyfarth

Vorgelegt über Prof. Dr. med. vet. J. Hirschberger  
der Medizinischen Kleintierklinik der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. K. Hartmann)

**Die Wirkung des Apoptose-hemmenden Proteins p35  
auf die Hämodynamik und die Infarktgröße im Herzinfarktmodell an der Ratte**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Martina Daniela Knödler  
aus  
Mutlangen

München, 2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Referent: Univ.-Prof. Dr. J. Hirschberger

Koreferent: Prov Dr. H. Roos

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

# INHALTSVERZEICHNIS

<b><u>1</u></b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	1
<b><u>2</u></b>	<b><u>SCHRIFTTUM</u></b>	2
2.1.	Stoffwechsel und Blutversorgung des Rattenherzens	2
2.2	Kardiale Ischämie	3
2.2.1	Definition der kardialen Ischämie	3
2.2.2	Formen der kardialen Ischämie	3
2.2.3	Mechanismen und Folgen des ischämischen Zellschadens	4
2.3	Nekrose	4
2.4	Apoptose - programmierter Zelltod	4
2.4.1	Definition	4
2.4.2	Apoptoseinduktion	5
2.4.3	Morphologische Zellveränderungen	7
2.4.4	Caspasen	8
2.4.4.1	Aktivierende Stimuli	9
2.4.4.2	Zielstrukturen in der Zelle	13
2.4.4.3	Caspase 3	13
2.5	Apoptoseinhibition	15
2.6	Antiapoptotisches Protein p35	16
2.8	Gentherapeutischer Ansatz	17
2.8.1	Prinzipien der Gentherapie	17
2.8.2	Adenoviraler Gentransfer	18

<b>3</b>	<b><u>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u></b>	20
3.1	Zielvorstellung	20
3.2	Material und Methodik	21
3.2.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	21
3.2.2	Versuchsplan und Gruppeneinteilung	22
3.2.3	Versuchsdurchführung	23
3.2.3.1	Anästhesie	23
3.2.3.2	Echokardiographische Messung	25
3.2.3.3	Thorakotomie	27
3.2.3.4	Adenoviraler Gentransfer	28
3.2.3.5	Postoperative Versorgung	29
3.2.3.6	Durchführung des kardialen Ischämie-Reperusionsmodells	29
3.2.3.7	Intrakardiale Blutdruckmessung	31
3.2.3.8	Euthanasie und Probengewinnung	32
3.2.3.9	Probenaufarbeitung	32
3.2.3.9.1	Durchführung der 2,3,5- Triphenyltetrazolium Chlorid (TTC) –Färbung	33
3.2.3.9.2	Durchführung der Bromphenolblaufärbung	33
3.2.3.9.3	Schneiden des Herzens	34
3.2.3.9	Planimetrische Auswertung	35
3.2.4	Statistische Auswertung	36
3.3.	Ergebnisse	37
3.3.1	Überlebensrate	37
3.3.2	Körpergewichtsverlauf	37
3.3.3	Hämodynamik	38
3.3.3.1	Echokardiographie	38
3.3.3.2	Tip-Katheter Messung	40
3.3.4	Herzgewicht	44
3.3.5	Infarktgröße	45

<b><u>4</u></b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	47
4.1	Diskussion des Versuchsmodells	47
4.1.1	Adenoviraler Gentransfer	47
4.2	Diskussion der Ergebnisse	49
4.2.1	Überlebensrate	49
4.2.2	Körpergewichtsverlauf	49
4.2.3	Funktionelle Herzparameter	50
4.2.4	Infarktgröße	51
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick	52
<b><u>5</u></b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	54
<b><u>6</u></b>	<b><u>SUMMARY</u></b>	56
<b><u>7</u></b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	58
<b><u>8</u></b>	<b><u>TABELLENVERZEICHNIS</u></b>	77
<b><u>9</u></b>	<b><u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u></b>	78
<b><u>10</u></b>	<b><u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u></b>	79
<b><u>11</u></b>	<b><u>DANKSAGUNG</u></b>	82
<b><u>12</u></b>	<b><u>LEBENS LAUF</u></b>	84

### 1 EINLEITUNG

Die Menschen, die einen akuten Myokardinfarkt überleben, erleiden trotz adäquater Therapie einen deutlichen Funktionsverlust des Herzens aufgrund des Untergangs von Herzmuskelgewebe. Dies verschlechtert die Lebensqualität und die Prognose für die Patienten nachhaltig (BRAUNWALD und BRISTOW, 2000).

Neben dem Zelltod durch Nekrose spielt der apoptotische Zelltod im Infarktgeschehen eine große Rolle. Der Verlust von Herzmuskelgewebe durch Nekrose im Vergleich zur Apoptose wird im Verhältnis auf 1:5 geschätzt (ANVERSA et al. 1998, BARTLING et al. 1998).

Die Ischämie und Reperfusion ist im Säugerherzen mit einer deutlichen Aktivierung des apoptotischen Zelltodes verbunden. Bisher gibt es keinen Therapieansatz, der das Ausmaß des programmierten Zelltodes im Infarktgeschehen bedeutend einschränken oder sogar verhindern kann.

Das Ziel der vorliegenden Studie ist die Untersuchung zur Effektivität eines adenoviral vermittelten Gentransfers des anti-apoptotischen Proteins p35 auf die Reduktion des Infarktschadens in der Ratte.

## 2            **SCHRIFTTUM**

### 2.1            **Stoffwechsel und Blutversorgung des Rattenherzens**

Das Herz der Ratte verfügt über ein duales Blutversorgungssystem. Das bedeutet, dass außer über die Koronararterien Teile des Herzens über akzessorische Gefäße versorgt werden (HALPERN 1957).

Die A. cardiomediastinalis stellt ein solches akzessorisches Gefäß dar. Sie entspringt auf der rechten Körperseite in der Hälfte der Fälle aus der A. thoracica interna, zu einem Drittel aus der A. subclavia und in manchen Fällen aus der A. carotis communis. Auf der linken Körperseite entspringt die A. cardiomediastinalis fast immer aus der A. thoracica interna und nur in seltenen Fällen aus der A. subclavia oder der A. costalis (HALPERN 1957).

Ursprung und Verlauf der A. interventricularis ist individuell unterschiedlich:

Sie entspringt zu 45% der Fälle aus der rechten und zu 55% aus der linken Koronararterie. Im ersten Fall tritt sie unmittelbar in das interventrikuläre Septum ein und verläuft dann geradlinig in Richtung Apex. Liegt ihr Ursprung in der linken Koronararterie, verläuft sie zuerst zwischen Aortenwurzel und Konus, um dann von kranial in das Septum einzutreten. Weiterhin verläuft die Arterie im Sulcus interventricularis und bildet einige Seitenäste, die mit Endästen der beiden Koronararterien am Rand des Septums anastomosieren können. Endäste die den Apex erreichen, treten in die Ventrikelwand ein.

Die A. coronaria dextra verläuft in dorsokaudaler Richtung über die rechte Ventrikelwand. Auf Höhe des rechten Herzohres entsendet sie zwei Äste an den rechten Vorhof. Andere Äste verlaufen nach dorsal und ventral auf den Sulcus interventricularis zu. Die A. coronaria sinistra zieht um den Truncus pulmonalis zur linken Ventrikelwand und gibt dort einen Ramus circumflexus ab. Ein Seitenast verläuft auf Höhe des linken Herzohres zum linken Vorhof. Andere Seitenäste versorgen die Ventrikelwand und die Randbereiche des Septums (BAKER et al. 1980, HEBEL und STROMBERG 1976).

## 2.2 Kardiale Ischämie

### 2.2.1 Definition der kardialen Ischämie

Das Myokard ist auf Sauerstoff zur Produktion von ATP durch oxidative Phosphorylierung im Mitochondrium angewiesen. Wenn das Sauerstoffangebot nicht ausreicht, um den Bedarf der Mitochondrien zu decken, beginnt das Myokard geringe Mengen an ATP durch anaerobe Glykolyse zu produzieren. Es kommt zur Akkumulation von Laktat, dem Endprodukt der anaeroben Glykolyse. Demzufolge wird myokardiale Ischämie heutzutage als Imbalanz zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf des Myokards definiert. Das Ausmaß der Imbalanz ist variabel und wird zusätzlich von der Lokalisation des Koronararterienverschlusses bestimmt (FOZZARD et al. 1991).

Hypoxie ist ein wichtiger Bestandteil der Ischämie, wobei eine Unterbrechung des koronaren Blutflusses nicht nur Hypoxie, sondern auch ein vermindertes Angebot an katabolischen Substraten und verminderten Abtransport der Metaboliten bedeutet (FOZZARD et al. 1991).

### 2.2.2 Formen der kardialen Ischämie

Die vollständige Unterbrechung des Blutflusses zu einer bestimmten Myokardregion bezeichnet man als *totale Ischämie*. Wenn die Imbalanz zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf auf einem erhöhten metabolischen Bedarf des Myokards beruht, während der koronare Blutfluss unbeeinträchtigt ist, spricht man von *relativer Ischämie*. Eine auf eine Region des Myokards beschränkte Ischämie definiert man als *regionale Ischämie*. Im Gegensatz dazu ist bei einer *globalen Ischämie* das ganze Herz betroffen (FOZZARD et al. 1991).

### **2.2.3 Mechanismen und Folgen des ischämischen Zellschadens**

### **2.3 Nekrose**

Das Auftreten einer Nekrose ist die Folge schwerer Abweichungen von physiologischen Bedingungen wie Hypoxie und Ischämie, (KLONER et al. 1974, GANOTE et al. 1977, JENNINGS et al. 1975) der Umgebungstemperatur (BUCKLEY 1972) oder der Zellmembranpermeabilität durch Toxine (MCLEAN et al. 1965).

Nekrose wird somit immer durch starke äußere Noxen ausgelöst, niemals durch intrinsische Faktoren der Zelle selbst. Nekrose ist immer ein pathologischer Prozess (DIVE et al. 1990).

Alle diese äußeren Faktoren führen auf verschiedenen Wegen zu ein und demselben Ereignis, das letztlich nekroseauslösend wirkt: Einem Anstieg der Membranpermeabilität. Folge sind ein erhöhter Natrium- und Wasserinflux in die Zelle, wodurch es zu einem Anschwellen aller Zellkompartimente, gefolgt von Membranrupturen und Zerstörung der Zellorganellen, kommt. Der Verlust der Basophilie von Zellkern und Zytoplasma führen zum sogenannten „ghosting“ der Zelle. Durch Austritt lysosomaler Enzyme kommt es zu einer starken Involvierung der Nachbarzellen und zu einer Aktivierung des Immunsystems mit Eintritt von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (Entzündung) (SAVILL 1997, SAINI und WALKER 1998, KAM und FERCH 2000).

### **2.4 Apoptose - programmierter Zelltod**

#### **2.4.1 Definition**

Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose eine Form des Zelluntergangs, der durch die genetische Information der Zelle selbst reguliert wird und durch den sich überflüssige oder geschädigte Zellen selbst zerstören können (EARNSHAW 1995).

Der Begriff Apoptose beschreibt im Altgriechischen das Abfallen der Baumblätter im Herbst (HIRAMINE 1997).

KERR et al. verwenden 1972 diesen Begriff erstmals zur Beschreibung des physiologisch auftretenden Zelltodes. In ihrem bahnbrechenden Artikel beschreiben sie apoptotische Vorgänge als einen natürlichen Prozess im Gewebe und als physiologischen Zelltod in der Embryonalentwicklung. Zudem stellt der apoptotische Zelltod eine lebenswichtige Grundlage weiterer biologischer Prozesse wie Gewebemöostase, Tumorregression und Lyse virusinfizierter Zellen dar (KERR et al. 1972, KAM und FERCH 2000). Die Balance zwischen Tod und Überleben der Zelle ist streng genetisch kontrolliert. Es ist die Aufgabe einer Vielzahl extrazellulärer und intrazellulärer Mediatoren, diese Balance aufrechtzuerhalten (STELLER 1995).

Dysregulationen dieser kontrollierenden Mechanismen haben pathologische Prozesse zur Folge. So wird eine gehemmte Apoptose mit Krebserkrankungen, Autoimmunerkrankungen und viralen Infektionen assoziiert. Eine erhöhte Apoptoserate wird dagegen bei Herz- und neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet (KAM und FERCH 2000).

### **2.4.2 Apoptoseinduktion**

Es werden zwei Stadien der Apoptoseinduktion unterschieden. Die erste Phase oder „decision phase“ stellt den genetischen Kontrollpunkt im apoptotischen Zelltodgeschehen dar. Die zweite Phase oder „execution phase“ ist verantwortlich für die morphologischen Veränderungen in der Zelle. Es existieren vier Gruppen von Stimuli, die Apoptose in einer Zelle auslösen können (KAM und FERCH 2000).

**GRUPPE 1:** Direkte Schädigungen der DNA z.B. durch ionisierende Strahlung (RUDIN und THOMPSON 1997).

**GRUPPE 2:** Apoptoseinduktion durch rezeptorvermittelte Mechanismen. Hier spielen vor allem die „Death Receptors“ (TNF-Faktor und FAS-Rezeptor) und die Entziehung des Wachstumsfaktors eine Rolle (RUDIN und THOMPSON 1997, MACLELLAN und SCHNEIDER 1997).

**GRUPPE 3:** Chemische Substanzen, die verstärkend auf bestimmte Komponenten der Apoptosekaskade wirken können. Hierzu gehören Phosphatase- und Kinase-Inhibitoren (SAVITZ und ROSENBAUM 1998).

**GRUPPE 4:** Faktoren, die eine direkte Zellmembranschädigung zur Folge haben wie Hitze, UV-Strahlung und oxidierende Substanzen (HAIMOVITZ-FRIEDMAN et al. 1994, SANTANA et al. 1996).

### **“Decision Phase“**

Genexpression und Proteinsynthese spielen eine wichtige Rolle in der Apoptose. Hierbei sind bereits alle benötigten Komponenten eines apoptotischen Programmes in jeder Zelle - so auch im Kardiomyozyten - vorhanden. Hierbei stellen die Proteine Bcl-2 und p53 zwei wichtige Genfamilien dar, wobei die Bcl-2-Familie die Apoptosemechanismen reguliert (TSUJIMOTO et al. 1985, VAUX et al. 1992, BROWN 1996).

Diese Proteine sind auf der mitochondrialen Membran und im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, wo sie die Funktion der Kalziumkanäle kontrollieren. Proteine wie Bcl-2 und BclxL alleine verhindern Apoptose, während Bcl-2, wenn es mit Proteinen wie Bax, Bad, Bak, Bclx, assoziiert ist, Apoptose induziert (HAUNSTETTER und IZUMO 1998, OLIVETTI et al. 1997).

Das p53 Gen ist ein 53-kDa Phosphoprotein, das an die DNA bindet und dort als Transkriptionsfaktor fungiert. Es kontrolliert die Zellproliferation und die Reparatur von DNA-Schäden. Mutationen von p53 werden in mehr als 50% der menschlichen Krebserkrankungen festgestellt und stehen im Zusammenhang mit dem Auftreten von Therapieresistenzen in der chemotherapeutischen Praxis (DONEHOVER 1992).

### **“Execution Phase“**

Die zentralen Ereignisse der Apoptose stehen in engem Zusammenhang mit der Aktivierung einer Familie von Cysteinproteasen, Caspasen genannt, die die weiter im Text beschriebenen morphologischen Zellveränderungen zur Folge haben (OBERHAMMER 1993, HAIMOVITZ-FRIEDMAN et al. 1994, WYLLIE 1997, THORNBERRY 1997).

### **2.4.3 Morphologische Zellveränderungen**

KAM und FERCH (2000) teilen den Ablauf der Apoptose in drei Phasen ein:

In der ersten Phase separiert sich die betroffene Zelle von ihren Nachbarzellen durch Verlust von Mikrovilli und Desmosomen (WYLLIE 1997).

Im Zellkern kommt es zur irreversiblen Chromatinkondensation. Danach wird die DNA von spezifischen Endonukleasen zuerst in große (50 bis 300 Kilobasenpaare) und letztlich in sehr kleine oligonukleosomale Fragmente gespalten und in Vesikel verpackt (STELLER 1995). Das endoplasmatische Retikulum schwillt an und es kommt zur Exozytose der Inhaltsstoffe. Die Zelle wird dichter in ihrer Erscheinung, da das Zytoplasma schrumpft (KAM und FERCH 2000).

In der zweiten Phase bildet die Zelle Pseudopodien aus, die entweder Zellorganellen oder Zellkernfragmente enthalten (budding). Die Zellfragmente werden in Vesikel verpackt und als „apoptotic bodies“ von der Zelle abgespalten (KERR et al. 1972, WYLLIE 1997, KAM und FERCH 2000).

In der dritten Phase wird die Zellmembran durchlässig. Die Apoptosekörper und die Vesikel werden daraufhin von Makrophagen, endothelialen Zellen, vaskulären Endothelzellen und Tumorzellen phagozytiert. Auf diese Weise werden tote Zellen sofort rückstandslos entfernt und jedes Austreten von toxischen Zellinhaltsstoffen verhindert. Es kommt demnach bei der Apoptose im Gegensatz zur Nekrose nicht zur Inflammation, Involvierung oder Schädigung von Nachbarzellen (WYLLIE 1997).

Die ursprüngliche Definition von Apoptose basiert auf strikten morphologischen Kriterien. Da jedoch bestimmte Zelltypen erheblich von diesem klassischen morphologischen Schema abweichen, ist heutzutage Apoptose funktionell definiert (HENGARTNER 1997).

### 2.4.4 Caspasen

YUAN et al. bringen 1993 erstmals Caspasen mit dem apoptotischen Zelltod in Verbindung. Systematische genetische Studien an *Caenorhabditis elegans* (Nematode, *C. elegans*) führen zu der Entdeckung, dass CED-3, ein Genprodukt, das für den apoptotischen Zelltod in *C. elegans* verantwortlich ist, mit Interleukin-1 $\beta$ -Converting-Enzym der Säuger (ICE oder Caspase 1) verwandt ist (CERETTI et al. 1992, THORNBERRY et al. 1992, YUAN et al. 1993).

Die gleichzeitige Entdeckung, dass Apoptose in Säugerzellen durch transiente Expression von ICE oder CED-3 ausgelöst werden kann (MIURA et al. 1993) führen DROIN et al. (2000) zu dem Schluss, dass eine konservierte Familie von Proteasen, „Caspasen“ genannt, die Hauptkomponente in diesem komplexen Zelltodmechanismus darstellen. Die Caspase-Familie stellt cysteinyl-aspartatspezifische Proteasen dar (Cysteinyl-Aspartasen) und umfasst 14 Säugerenzyme, von denen 11 beim Menschen nachgewiesen werden können (DROIN et al. 2000).

Caspasen werden ausschließlich als katalytisch inaktive Proenzyme exprimiert. Diese sind aus einer unterschiedlich langen amino-terminalen Prodomäne, einer großen Untereinheit (bis ca. 20 kd) und einer kleinen Untereinheit (bis ca. 10 kd) aufgebaut (CRYNS und YUAN 1998, THORNBERRY und LAZEBNIK 1998).

CRYNS und YUAN teilen 1998 Caspasen anhand ihrer Substratspezifität in drei Subgruppen ein:

Die erste Subgruppe (Caspase 1, -4 und -5) bevorzugt große hydrophobe Substratreste am P4-Ende für den enzymatischen Umsatz.

Die zweite Untergruppe (Caspase 2, -3 und -7) setzt vor allem Aspartat am P4 Ende um.

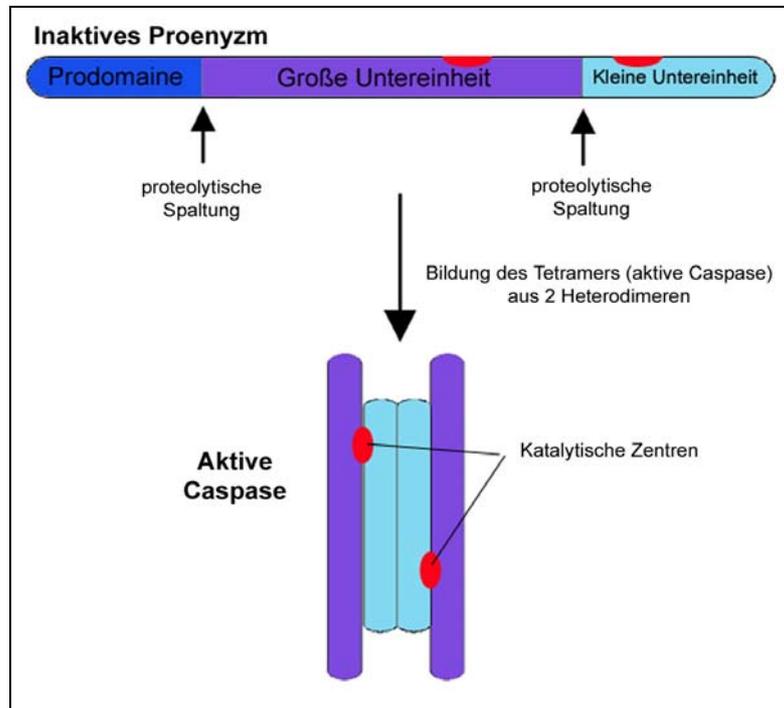
Die dritte Gruppe, die sich aus Caspase 6, -8, -9 zusammensetzt, ist unspezifischer in ihrer Substratwahl am P4-Ende

Zusätzlich zu ihrer unterschiedlichen Substratspezifität differieren Caspasen in der Länge und Sequenz ihrer amino-terminalen Prodomäne.

Caspase 1, -2, -4, -5, -8, -9 und -10 haben lange Prodomänen, wobei Caspase 3, -6, -7 und -11 kurze Prodomänen haben (CRYNS und YUAN 1998).

Die Aktivierung der Caspase ist ein proteolytischer Prozess bei dem die oben beschriebenen drei Untereinheiten der inaktiven Caspase gespalten werden (wie in Abb.1 dargestellt). Die Prodomäne wird entfernt und ein Heterodimer aus einer kleinen

und einer großen Untereinheit gebildet (WALKER et al. 1994, WILSON et al. 1994, ROTONDA et al: 1996).



(modifiziert nach LOS und WALCZAK 2002)

## Abb. 1 Bildung der aktiven Caspase

Caspasen liegen in Form inaktiver Proenzyme vor, die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden können. Im Zuge dieser Spaltung wird die N-Terminale Prodomäne entfernt und die große und kleine Untereinheit hervorgebracht, die sich zu einem Heterodimer formen. Die aktive Caspase stellt ein Tetramer, bestehend aus zwei solcher Heterodimere (CRYNS und YUAN 1998).

### 2.4.4.1 Aktivierende Stimuli

Apoptose wird von vielen verschiedenen getrennten Signalen kontrolliert (TRAUTH et al. 1989, NAGATA 1993, 1994).

Zwei interagierende Kaskade-auslösende Signalwege führen zur Aktivierung der Hauptinitiatorenzyme (z.B. Caspase 3) und konvergieren somit zum Ablauf des apoptotischen Programmes (wie in Abb.2 dargestellt).

### **Rezeptorvermittelte Aktivierung:**

In den letzten Jahren sind verschiedene sogenannte „Death-Receptors“ identifiziert worden, die alle zur Familie der „Tumor-Necrosis-Factor“ (TNF)-Genfamilie gehören. Zwei strukturell verwandte Zytokinrezeptoren dieser Genfamilie, TNFR1 und der CD95-Rezeptor, (Fas/APO-1) lösen bei Aktivierung durch ihre Liganden (TNF- $\alpha$  und FasL) binnen Stunden Apoptose aus. Es besteht eine direkte, nichttranskriptionale Kopplung zwischen den Zytokinrezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie und der Caspase-aktivierung. RUDIN und THOMPSON (1997) haben die Existenz dieser sogenannten Death-Receptors auch auf Kardiomyozyten nachgewiesen. Der zur Familie der Glycoproteinrezeptoren gehörende CD95-Rezeptor wird durch FAS aktiviert. Nach seiner Aktivierung werden intrazellulär Proteine wie z.B. die Fas-assoziierten-death-Domains (FADD) vom Liganden (FAS) selbst produziert. FADD enthalten sogenannte Adaptermoleküle, die „Death-Effector-Domains“ (DED) (RUDIN und THOMPSON 1997, MACLELLAN und SCHNEIDER 1997).

### **Mitochondrial aktivierte Caspase-Kaskade**

Nach Einwirkung von schädigenden Einflüssen kommt es zur Ausschüttung von Cytochrom C aus dem intermembranären Raum der Mitochondrien ins Zytoplasma. Zytosolisches Cytochrom C bindet an den „apoptosis protease activating factor“ (Apaf-1) und induziert dessen Oligomerisierung (LIU et al. 1997, ZOU et al. 1997, ZOU et al. 1999).

Das aktivierte Apaf-1 bindet daraufhin an Procaspase 9 und führt dort zu einer proteolytischen Selbstaktivierung von Procaspase 9. Dies hat wiederum die Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 zur Folge (LI et al. 1997, NARULA et al. 1999).

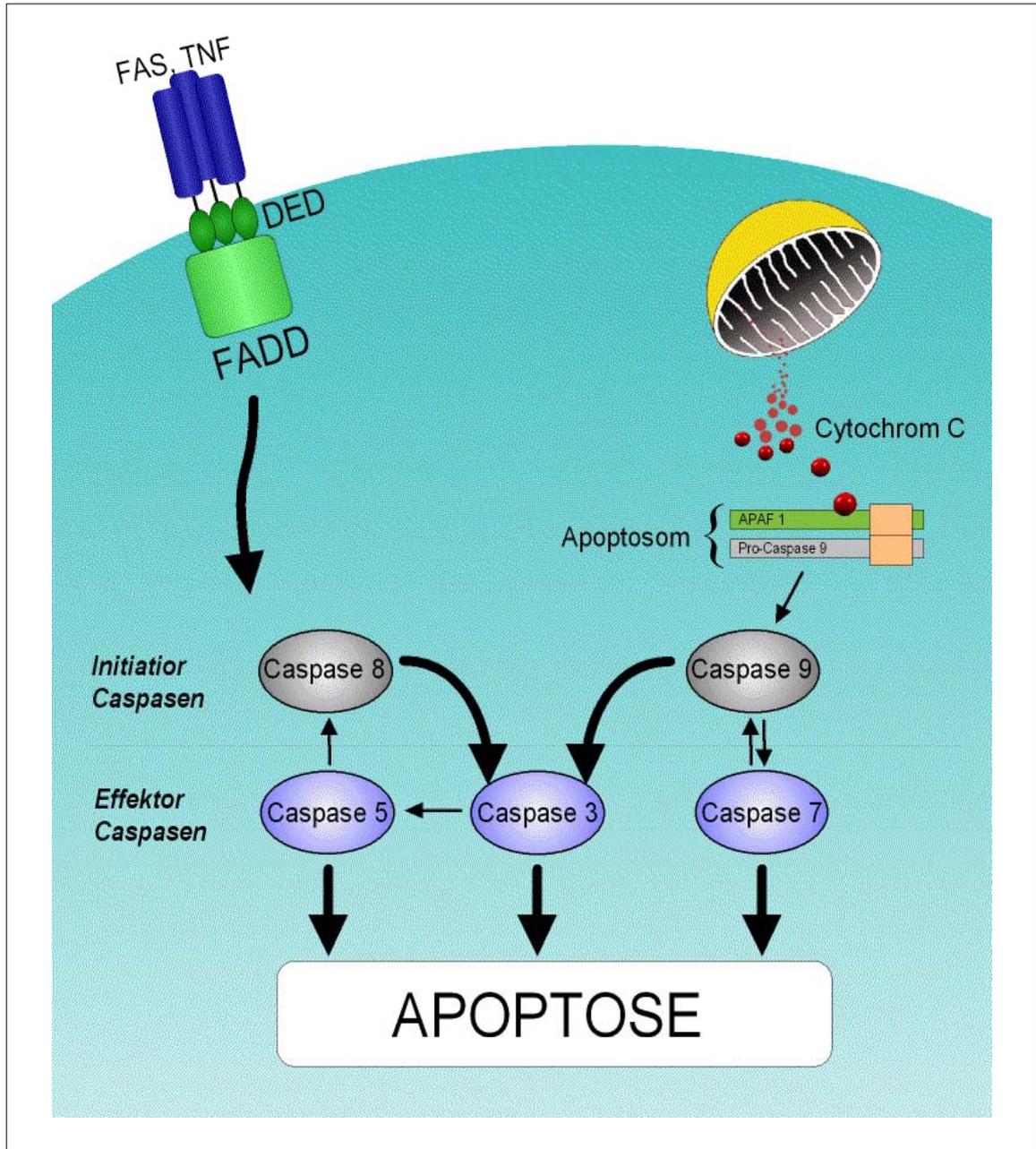
Weitere Caspase-aktivierende Proteine sind der „apoptosis inducing factor“ (AIF) (SUSIN et al. 1997) oder die Procaspase 3 (MANCINI et al. 1998). Diese können ebenfalls von den Mitochondrien freigesetzt werden (SUSIN et al. 1997; MANCINI et al. 1998).

Der apoptosis-inducing-factor (AIF), ein mitochondriales Flavoprotein, kann durch seine proteolytische Aktivität die Caspase-Kaskade direkt aktivieren. Außerdem spielt AIF durch Migration in den Zellkern bei der direkten DNA Fragmentation eine wichtige Rolle (THORNBERRY et al. 1997, SLEE et al. 1999).

### **Variationen des apoptotischen Programmes**

Obwohl dem funktionellen Ablauf des apoptotischen Programmes ein immer gleichbleibendes Muster zugrunde liegt, können einzelne Schritte je nach Zelltypus variieren. Beispielsweise zeigen Kardiomyozyten nicht die klassische Morphologie, die mit Apoptose in anderen Geweben assoziiert ist (REED und PATERNOSTRO 1999). So sind zum Beispiel die Konsequenzen der Cytochrom C-Ausschüttung aus dem Mitochondrium vom Zelltyp abhängig. In Zellen die ein Übermaß an Cytochrom C beinhalten, verbleibt nach der Caspasenaktivierung noch genügend Cytochrom C, um den Elektronentransport der Zelle aufrechtzuerhalten. In diesem Falle können Sauerstoffverbrauch und ATP-Synthese zunächst weiterhin ungestört stattfinden. Andererseits kann in Zellen, die über große Mengen endogener Caspaseinhibitoren verfügen, die mitochondriale Cytochrom C-Ausschüttung eine Caspaseaktivierung verfehlen. Stattdessen kann die Zelle durch Verlust des Elektronentransportes (aufgrund des Mangels an Cytochrom C) in die Nekrose übergehen (THORNBERRY und LAZEBNIK 1998).

Mitochondrien mancher Zellen enthalten Procaspase 3, die während des Ablaufs des apoptotischen Programmes ins Zytoplasma freigesetzt wird (MANCINI et al. 1998).



(modifiziert nach LOS und WALCZAK 2002)

## Abb. 2 Mechanismus der Apoptose

Darstellung der verschiedenen Wege zur Aktivierung der Caspase-Kaskade. Man unterscheidet 4 verschiedene apoptose-induzierende Stimuli (physiologische Aktivatoren, schädigungsbedingte Aktivatoren, therapiebedingte Aktivatoren, Toxine). Diese Stimuli können über verschiedene Wege zur Aktivierung der Caspase-Kaskade führen (mitochondriale Aktivierung, rezeptorvermittelte Aktivierung, direkte Aktivierung der Initiatorcaspasen).

### 2.4.4.2 Zielstrukturen in der Zelle

Nach ihrer Aktivierung initiieren die Caspasen das apoptotische Programm durch Spaltung bestimmter Proteine. Die Caspase-abhängige Spaltung führt entweder zur Aktivierung eines inaktiven proapoptotischen Proteins oder zur Inaktivierung eines für das Zellüberleben notwendigen Proteins (CRYNS und YUAN 1998, THORNBERRY et al. 1997)

Ein Beispiel für die erste Gruppe ist die Aktivierung von caspase-activated-deoxyribonuclease (CAD), eine Endonuklease, die für die DNA-Fragmentation im Zellkern verantwortlich ist. In nicht apoptotischen Zellen liegt sie an Inhibitor von CAD (ICAD) gebunden als inaktives Enzym vor. Durch Spaltung von ICAD durch Caspase 3 wird CAD aktiviert (ENARI et al. 1998).

Ein Beispiel für die zweite Gruppe ist die Inaktivierung Apoptose-hemmender Proteine wie Bcl-2 und Bcl-xL. CHENG et al. (1997) konnten zeigen, dass durch die Caspase-abhängige Spaltung Bcl-2 nicht nur seine Apoptose-hemmende Eigenschaft verliert, sondern sogar proapoptotische, dem Bax ähnliche Funktionen erhält.

Ein Beispiel für die Inaktivierung eines lebenswichtigen Strukturproteins ist die Spaltung von Lamin, das zur Aufrechterhaltung der nukleären Struktur notwendig ist. Proteine wie Fodrin und Actin gehören zu den Proteinen des Zytoskeletts und werden ebenfalls während der Apoptose gespalten (ORTH et al. 1996, TAKAHASHI 1996).

Zusätzlich kommt es zur Inaktivierung von Proteinen, die bei der DNA-Reparation, dem mRNA-Splicing und der DNA-Replikation notwendig sind (CRYNS und YUAN 1998).

### 2.4.4.3 Caspase 3

Caspase 3, von TEWARI et al. (1995) „Yama“ genannt (hinduistischer Gott des Todes), spielt eine Schlüsselrolle im apoptotischen Zelltodgeschehen. Sie stellt neben Caspase 6 und Caspase 7 die wichtigste Effektorcaspase dar (TEWARI et al. 1995).

Die Aktivierung von Caspase 3 in der Apoptosekaskade führt direkt zu den typischen morphologischen und molekularen Veränderungen der Zelle (BUMP et al. 1995).

Zahlreiche Studien haben die zentrale Rolle der Caspase 3 im Ablauf der Apoptose belegt. KUIDA et al. führen 1996 Untersuchungen an durch homologe Rekombination hergestellten Caspase 3-defizienten Mäusen durch. Diese Mäuse zeigen eine deutlich beeinträchtigte Gehirnentwicklung, wobei bereits ab dem 12. Tag der Embryonalentwicklung Gehirnhyperplasien verschiedener Art festgestellt werden können. Die Lebenserwartung der Caspase 3-defizienten Mäuse betrug nur 1 bis 3 Wochen. Apoptotische Zellen, die in sich normal entwickelnden Mäusegehirnen festgestellt werden, fehlen in Caspase 3-defizienten Mäusegehirnen vollständig. Dies beweist, dass die Caspase 3 eine entscheidende Rolle in der Apoptose spielt (KUIDA et al. 1996).

Die Caspase 3 liegt normalerweise als inaktives Proenzym in den Mitochondrien vor. Das aktive Enzym besteht aus zwei Untereinheiten von 17 und 12 kDa (NICHOLSON 1995).

Die Aktivierung der Caspase 3 kann entweder innerhalb der Caspase-Kaskade selbst durch die Caspasen 8, -10 und -2 oder mitochondrial über Apaf-1, Cytochrom C und die Caspase 9 (Apoptosom) oder AIF erfolgen (siehe Abb.2) (TEWARI et al. 1995, LIU et al. 1995, NARULA et al. 1999).

Während der „execution phase“ der Apoptose ist die Caspase 3 entweder vollständig oder zumindest partiell für die Proteolyse einer Vielzahl von Substraten verantwortlich (LAZEBNIK et al. 1994).

### **Apoptose in Herzmuskelzellen**

Wie in anderen Geweben und Organen, ist auch im Herzmuskelgewebe der apoptotische Zelltod essentiell für die embryonale Entwicklung des Herzens (CLARK 1984).

Zum Zeitpunkt der Geburt ist die Anzahl der Kardiomyozyten und die DNA Synthese in beiden Ventrikeln fast gleich hoch. Die Anzahl der Kardiomyozyten im linken Ventrikel erhöht sich auf ungefähr das Doppelte der des rechten Ventrikels. KAJUSTRA et al. zeigen 1995, dass 1, 5 und 11 Tage nach der Geburt die Anzahl der apoptotischen Kardiomyozyten in der rechten Ventrikelwand signifikant höher ist als in der linken (KAJUSTRA et al. 1995).

Der Herzmuskel stellt nach Abschluss der postnatalen Entwicklungsphase ein terminal differenziertes Gewebe dar. Die Apoptose im adulten Herzmuskel stellt deshalb einen pathologischen Zustand dar (COLUCCI 1996, MACLELLAN und SCHNEIDER 1997).

UMANSKY et al. zeigen 1996 an Hundeherzen, dass Ischämie und Reperfusion nekrotischen und apoptotischen Zelltod von Kardiomyozyten hervorrufen, wobei Nekrose erst bei lang andauernden Ischämien auftritt (UMANSKY et al. 1996).

Durch Studien an Kaninchenherzen zeigen GOTTLIEB et al. (1994), dass die Initiierung von Apoptose während der Ischämie auftritt, jedoch unter rein ischämischen Bedingungen nicht fortschreitet.

### **2.5 Apoptoseinhibition**

Es existieren zwei Gruppen von Caspaseinhibitoren. Eine Gruppe, die die Caspaseaktivierung inhibiert und eine Gruppe, die die Aktivität der Caspase blockiert (RUDEL 1999).

#### Inhibitoren der Caspaseaktivierung

Die Klasse von Proteinen, die auf diese Weise anti-apoptotisch wirken, wurde in Viren gefunden. So enthält z.B. sowohl das humane Herpesvirus-8 als auch das humane Molluscipoxvirus ein Gen für die sogenannten viral-FLICE - inhibitory-proteins (vFLIP) (THOME et al. 1997). v-FLIPs enthalten eine „Death Effector Domain“ die mit dem Adaptorprotein FADD interagiert und dabei die Aktivierung von Caspase 8 verhindert (THOME et al. 1997)

Die selbe Arbeitsgruppe isoliert ein humanes Homolog; das FLICE-inhibitory protein (FLIP). Das humane FLIP agiert auf dieselbe Weise wie das virale FLIP:

Es verhindert Apoptose, die von den Death-Rezeptoren hervorgerufen wird, nicht aber die durch Strahlung und Chemotherapeutika induzierte Apoptose (KATAOKA et al. 1998).

Im Herzgewebe werden hohe Expressionen von FLIP festgestellt (IRMLER et al. 1997). Dabei ist interessant, dass die Expression von FLIP in apoptotischen Kardiomyozyten nach Ischämie/Reperfusion niedrig ist, aber die umliegenden nicht betroffenen Kardiomyozyten eine hohe Expression von FLIP aufweisen (RASPER et al. 1998).

### Inhibitoren der Caspaseaktivität

1992 weisen RAY et al. in dem Cowpox virus cytokine-response-modifier A (CrmA) eine direkte Inhibition der Caspaseaktivität nach (RAY et al. 1992).

CrmA verhindert Apoptose durch direkte Blockade von Caspase 8 (MUZIO et al 1996, ZHOU et al. 1997).

Obwohl CrmA nur wenig Affinität zu den Initiatorcaspasen besitzt, wirkt es sehr stark inhibitorisch auf Caspase 1, deren Aktivität für die Entstehung der aktiven Zytokine Interleukin 1 $\beta$  und Interferon- $\gamma$ -inducing-factor verantwortlich ist (NICHOLSON und THORBERRY 1997, SALVESEN und DIXIT 1997).

Die „inhibitor of apoptosis proteins“ (IAP) stellen ebenfalls baculovirale Proteine dar, die aber strukturell nicht mit dem p35 verwandt sind. Zur Zeit werden 5 verschiedene IAP-Proteine in Säugerzellen beschrieben (UREN et al. 1997).

Sie verhindern die Aktivität der Initiatorcaspase 9 und der distaleren Caspasen 3 und 7, nicht aber die der Caspase 8 (DEVERAUX et al. 1997, 1998, ROY et al. 1997).

Das 1998 von KOSEKI et al. isolierte „apoptosis repressor with apoptosis recruitment domain“ (ARC) wird speziell im Skelettmuskel und im Herzmuskel exprimiert. Im Gegensatz zu den IAPs hemmt ARC die Aktivität von Caspase 8, hat aber keinen Einfluss auf die Caspasen 3 und 9 (KOSEKI et al. 1998).

Apoptoseinhibitoren der Bcl-2 Familie wie das Bcl-2 und das Bcl-XL gehören zu den zellulären Inhibitoren (MACLELLAN und SCHNEIDER 1997).

### **2.6 Anti-apoptotisches Protein p35**

Damit die Virusvermehrung in der infizierten Wirtszelle ungehindert fortgesetzt werden kann, haben Viren Mechanismen entwickelt, die eine vorzeitige Apoptose der Wirtszelle unterdrücken (OLTVAI und KORSMEYER 1994).

Die Baculoviren *Autographa californica* und *Bombyx mori* beinhalten ein dem CrmA ähnliches 35-kDa Protein (p35), das Apoptose in Baculovirus-infizierten Insektenzellen inhibiert (CLEM et al 1991, KAMITA et al. 1993, CLEM und MILLER 1994). Darüber hinaus verhindert die Expression von p35 Apoptose in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und in Säugerzellen (CLEM et al. 1991).

Weitere Studien haben gezeigt, dass der Mechanismus der Apoptosehemmung mit p35 speziesunspezifisch ist (HAWKINS et al. 1996, BERTIN et al. 1996). Die Apoptose-

inhibierende Eigenschaft von p35 liegt in der Funktion als Pseudosubstrat für eine oder mehrere Caspasen (CRYNS und YUAN 1998). Die Spaltprodukte von p35 bilden mit der aktiven Caspase stabile Komplexe, wodurch die Caspase an ihrer weiteren proteolytischen Aktivität gehindert wird (BERTIN et al. 1996). BUMP et al. (1995) demonstrieren, dass die Komplexbildung zwischen p35 und der aktiven Caspase irreversibel ist.

BEIDLER et al. (1995) zeigen, dass p35 nicht nur FAS- und TNF- induzierte Apoptose verhindert sondern auch die FAS- und TNF-induzierte Spaltung von PARP. Bisher konnte gezeigt werden, dass p35 die humanen Caspasen 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, und 10 erfolgreich inhibiert (ZHOU 1998).

Das baculovirale Gen p35 gilt somit als ein effektiver Suppressor des programmierten Zelltodes (BERTIN 1996).

## **2.8 Genterapeutischer Ansatz**

### **2.8.1 Prinzipien der Genterapie**

Unter dem Begriff „Genterapie“ versteht man ganz allgemein das Einbringen von genetischem Material in somatische Zielzellen, um die ererbte oder erworbene "Fehlerquelle" durch die Bildung eines fehlenden oder therapeutischen Proteins zu korrigieren (RAPACCIUOLO et al. 1994).

Gene sind die grundlegende Funktionseinheit, die alle physiologischen, aber auch unphysiologischen und sogar pathologischen Abläufe kodieren und steuern. Erst durch diese Definition einer Erkrankung auf molekularer Ebene, wird ein präziser und effektiver Therapieansatz möglich (MULLIGAN 1993, ROBERTS 2001).

Für die Durchführung eines genterapeutischen Ansatzes werden nach HAJJAR et al. (2000) drei Grundelemente benötigt:

Grundsätzlich ist ein Vektor oder Transportmedium notwendig, in dem das Genmaterial sicher in die Zielzelle gebracht wird. Zum Zweiten muss dieser Vektor möglichst sicher in das Zielorgan eingeschleust werden. Drittens muss ein geeignetes Gen verwendet werden, dass zuverlässig in den Zielzellen exprimiert wird.

Zwei Typen von gentherapeutischen Ansätzen müssen nach ECKHARDT et al. (1999), NABEL und DZAU (2001) unterschieden werden:

Erstens die Keimbahntherapie, bei der Zellen therapiert werden, die ihre genetische Information an die nächste Zellgeneration weitergeben (Vorläufer der Ei- und Samenzellen, reife Ei- und Samenzellen und frühe embryonale Stadien eines Individuums). Zweitens die somatische Gentherapie, bei der nur somatische Zellen behandelt werden, die ihr Erbgut nicht an eine weitere Zellgeneration weitergeben. Der gentherapeutische Effekt bleibt somit auf die behandelte Zellpopulation beschränkt (NABEL und DZAU 2001).

### 2.8.2 Adenoviraler Gentransfer

Neben Retroviren, Vaccina-Viren, Polio- und Adeno-assoziierten Viren, werden v.a. Adenoviren (Ad) als Genvektoren in der somatischen Gentherapie eingesetzt (MULLIGAN 1993).

Hier sind v.a. die Replikations-defizienten Vektoren basierend auf dem humanen Adenovirus der Serotypen 2 und 5 der Subgruppe C (Ad2, Ad5) zu nennen (ZHANG 1999, RUSSELL 2000). Der primäre zelluläre Ad-Rezeptor „CAR“, an den auch Coxsackieviren binden, ist in den Geweben des Körpers weitverbreitet (BARNETT et al. 2002).

Ad2/Ad5 sind aus mehreren Gründen vielversprechende Vektorsysteme. Erstens ist Ad fähig, *in vivo* sowohl sich teilende, als auch ruhende Zellen effizient zu transfizieren. Zweitens besitzen Ad eine hohe *in vivo* – Stabilität. Ein dritter wichtiger Faktor ist die Möglichkeit, diesen Ad-Vektor in hohen Titern herzustellen, was für einen möglichen therapeutischen Einsatz unabdingbar ist. Ein weiterer Punkt ist die relative Sicherheit dieses Vektors für den Wirtsorganismus, da Ad nicht onkogen sind und sich Ad-assoziierte Erkrankungen auf milde Infektionen des Respirationstraktes beschränken (BARNETT et al. 2002).

Neben den oben genannten Vorteilen des Einsatzes von adenoviralen Vektoren, sind auch einige Nachteile dieses Vektorsystems zu nennen, die den Erfolg dieser Strategie limitieren. Die Fähigkeit des Vektors, eine Vielzahl von Zelltypen anzusprechen, macht es schwierig, seine Wirkung auf einen bestimmten Zelltypus zu beschränken (YEE et al. 1996).

Tierversuche haben nach YEE et al. (1996) ergeben, dass verabreichte Adenoviren sequestrieren und v.a. in der Leber toxisch wirken. Diese Unspezifität des Vektors schränkt auch die Möglichkeit der systemischen Applikation ein, da eine unerwünschte Genexpression in gesunden Geweben, bzw. Organen (auch hier v.a. in der Leber) nicht ausgeschlossen werden kann. Gleichzeitig sinkt wegen der o.g. Sequestrierung in gesunde Gewebe die Effizienz des Gentransfers nach systemischer Gabe (BRAND et al. 1997).

Auch sind genau die Zielzellen für gentherapeutische Eingriffe (Lungenepithelzellen, Krebszellen) aufgrund ihres relativen Mangels an CAR, schlecht mit adenoviralen Vektoren zu erreichen (CRYSTAL et al. 1997, STERMAN et al. 1998, ALVAREZ et al. 2000).

Adenoviren sind unbehüllte Doppelstrang-DNA-Viren und die Konstruktion eines "Ad-Vektors" läuft folgendermaßen ab:

Bei Replikations-kompetenten Adenoviren werden bei Eintritt in die Wirtszelle das „early gen“ (E1) exprimiert und dies führt dann zur Expression weiterer „early genes“ (E2 bis E4). In der zweiten Phase der Virusreplikation werden die sog. späten Gene, „late genes“ (L1 bis L5) exprimiert, welche dann zur weiteren Virusproduktion und somit zur Lysis der Wirtszelle führen. Bei der Veränderung des Virusgenoms zum Vektorgenom wird das Virus nun durch die Deletion des E1 Replikations-defizient gemacht und die freigewordene Kapazität im Virusgenom zum Einbau eines Transgens verwendet (GRAHAM und PREVEC 1995, WILSON 1996, HE et al. 1998).

### 3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

#### 3.1 Zielvorstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Wirkung des anti-apoptotischen Proteins p35, das durch adenoviralen Gentransfer im ischämischen Myokard der Ratte exprimiert wird, auf die Myokardfunktion und Hämodynamik zu untersuchen.

Es soll erkannt werden, ob eine anti-apoptotische therapeutische Intervention mit dem Caspase-3-Hemmer p35 bei ischämischem Myokardschaden einen Effekt auf die Myokardfunktion und Hämodynamik in vivo zeigt.

Die Basis eines solchen Therapieansatzes liegt in der zentralen Bedeutung des apoptotischen Zelltodes bei der Entstehung eines myokardialen Infarktschadens.

Gegenüber der mit p35 transfizierten Versuchsgruppe dient als Kontrollgruppe eine mit „green fluorescent protein“ (GFP) transfizierte Gruppe. Die beiden Gruppen werden unter standardisierten Bedingungen im Ischämiemodell der Ratte verglichen.

Die Transfektion der Kardiomyozyten mit dem anti-apoptotischen Protein p35 oder dem Markergen GFP erfolgt durch direkte myokardiale Injektion Replikations-defizienter, transgener Adenoviren. Die Effektivität des Gentransfers wird immunhistochemisch überprüft und die Expression des anti-apoptotischen Proteins p35 beurteilt. Da das Expressionsmaximum von p35 zwischen Tag 4 und 7 liegt (BAUMGARTNER 2002), wird der Gentransfer drei Tage vor dem Infarkt durchgeführt um bei Einsetzen der Ischämie und Reperfusion ein Expressionsmaximum erreicht zu haben. In den Untersuchungen der Expressionsdauer von p35 an Einzelkardiomyozyten konnte an Tag 0 keine messbare Expression festgestellt werden (BAUMGARTNER 2002). Der Infarktschaden wird bei den Tieren in Form einer Ischämie mit darauffolgender Reperfusion durch koronare Ligatur hervorgerufen.

Zur In-vivo-Beurteilung des erzeugten myokardialen Infarktes und der Effekte des lokalen Gentransfers auf die Herzfunktion werden die Tiere am Tag 0, 3 und 4 echokardiographisch untersucht. Zur Beurteilung der Hämodynamik erfolgt am Tag 4 eine linksventrikuläre Druckmessung.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

GRUPPE	n	Tag 0	Tag 3	Tag 4
<b>KONTROLL-GRUPPE GFP</b>	15	Gentransfer GFP KGW Echo	KGW Echo Ischämie/ Reperfusion	KGW Echo linksventrikulärer Druck Organentnahme
<b>VERUM-GRUPPE P35</b>	18	Gentransfer p35 KGW Echo	KGW Echo Ischämie/ Reperfusion	KGW Echo linksventrikulärer Druck Organentnahme

**Tabelle 1    Versuchsplan**

### 3.2            Material und Methodik

#### 3.2.1        Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die Untersuchungen werden an männlichen Wistar Ratten (Harlan Winkelmann GmbH, Borchon) mit Körpergewichten zwischen 300 und 350 g durchgeführt. Vor der ersten Operation werden die Ratten zu viert in einem Gruppenkäfig (Makrolon Typ 4, Ehret GmbH, Emmendingen) über eine Adaptationszeit von mindestens einer Woche gehalten.

Die Ratten sind gemäß den Vorgaben zur Versuchstierhaltung bei einer Raumtemperatur von 20 bis 23°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 bis 60% und bei einem zwölfstündigen Hell-Dunkelrhythmus (in der Hellphase 50 bis 100 Lux im Käfig) gehalten.

Futter (Alleinfutterpellets für Ratten und Mäuse „ssniff R/M-Haltung, 10 mm, nitrosaminarm“ der Fa. ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Wasser steht den Tieren ad libitum zur Verfügung. Die Einstreu in den Käfigen besteht aus entstaubter und entkeimter Holzfaser (Fa. Altromin, Lage/Lippe).

Aufstallung, Operation und die Organentnahme werden in den Räumen des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforchung der Technischen Universität München durchgeführt. Die histologischen Laboruntersuchungen erfolgen im kardiologischen Katecholaminlabor der 1. Medizinischen Klinik der Technischen Universität München.

Das vorliegende Tierversuchsvorhaben wurde von der Regierung von Oberbayern genehmigt (gemäß des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG) i.d.F. vom 25.05.1998.)

### 3.2.2 Versuchsplan und Gruppeneinteilung

Die Gesamtdauer des Versuchs erstreckt sich über einen Zeitraum von vier Tagen.

Am Tag 0 wird bei den Tieren eine Thorakotomie durchgeführt, bei der durch myokardiale Injektion die Infektion der linken Ventrikelwand mit einem rekombinanten Adenovirus erfolgt.

Nach 3 Tagen ist die Expression des anti-apoptischen Proteins p35 am höchsten. Die Tiere werden deshalb zur Erzeugung des Infarktschadens am Tag 3 erneut thorakotomiert. Zusätzlich werden die Tiere beider Gruppe an Tag 0, 3 und vier (Basalmessung, Messung prä-Infarkt, Messung post-Infarkt) einer echokardiographischen Messung unterzogen. Parallel dazu wird an denselben Tagen jeweils das Körpergewicht registriert. Am Versuchsende (Tag 4) erhalten die Tiere eine linksventrikuläre Druckmessung via Tip-Katheter zur Ermittlung linksventrikulärer Druckparameter. Anschließend wird das Herz implantiert mit Tetrazoliumchlorid und Bromphenolblau gefärbt um die spätere *ex vivo* stattfindende Infarktgrößenmessung zu ermöglichen.

### In-vivo-Untersuchungen

- ▶ **echokardiographische Untersuchung**
  - am Tag 0 zur Erhebung eines Basalwertes.
  - am Tag 3 zur Beurteilung des Einflusses der Direktinjektion des adenoviralen Vektors auf die kardiale Funktion.
  - am Tag 4 zur Beurteilung des erzeugten myokardialen Infarktes und der Effekte des Gentransfers auf die Herzfunktion.
  
- ▶ **linksventrikuläre Tip-Katheter Messung**
  - am Tag 4 zur Beurteilung der Hämodynamik.

### Ex-vivo-Untersuchungen

- ▶ **Immunhistochemie**
  - zum Nachweis von p35 und GFP im Myokard um den Transfektionserfolg nachzuweisen.
- ▶ **Planimetrie**
  - Bestimmung der Infarktgröße durch planimetrische Messung am geschnittenen Herzen.

### Guppeneinteilung

#### **p35-Versuchsgruppe:**

Der Infarktschaden wird bei den Tieren durch 30-minütige Ligierung der LAD und anschließende Reperfusion (24 h) hervorgerufen. Die Transfektion der Kardiomyozyten erfolgt mit 200 µl Virussuspension Ad-p35-GFP (Titer:  $2,5 \times 10^8$  pfu) drei Tage vorher durch direkte Injektion in das Myokard des linken Ventrikels.

#### **GFP-Kontrollgruppe:**

Der Infarktschaden wird bei diesen Tieren auf die gleiche Weise hervorgerufen wie bei den p35-Tieren. Die Transfektion der Kardiomyozyten mit 200 µl Ad-GFP (Titer:  $2,5 \times 10^8$  pfu) erfolgt ebenfalls durch direkte Injektion in das Myokard des linken Ventrikels. Die Gruppe durchläuft das Versuchsprotokoll vollständig und dient als Kontrollgruppe gegenüber der p35-Versuchsgruppe.

### **3.2.3 Versuchsdurchführung**

#### **3.2.3.1 Anästhesie**

Die männlichen Wistar Ratten (300 - 350 g) werden mit einer voll antagonistischen Injektionsanästhesie, die sich aus Midazolam (DORMICUM® 2mg/kg/KGW), Mede-

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

---

tomidin (DOMITOR® 0,15 mg/kg/KGW) und Fentanyl (FENTANYL® 0,005 mg/kg/KGW) zusammensetzt, durch intramuskuläre (i.m.) Injektion narkotisiert.

Nach Eintreten der Narkose wird das Tier im Bereich des Sternums und an der linken Thoraxseite rasiert und mit Hilfe eines modifizierten Kinderlaryngoskops mit einer Venenverweilkanüle (VENFLON PRO, 16GA Fa. Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden) intubiert (siehe Abb.3). Das intubierte Tier positioniert man auf einer durch ein steriles Tuch abgedeckten Wärmeplatte in Rückenlage. Die Augen werden mit Augensalbe (BEPANTHEN® Augen- und Nasensalbe, Roche, Grenzach-Wyhlen) vor dem Austrocknen geschützt. Nun beatmet man das Tier mit Hilfe einer volumengesteuerten Beatmungspumpe (Anesthesia Workstation, Voelker GmbH, Kaltenkirchen) mit 100% Sauerstoff und einer Atemfrequenz von 50 bis 60 Atemzügen pro Minute kontrolliert. Zur Überwachung der Herzfrequenz und Sauerstoffsättigung wird im Bereich der Mittelfußknochen der Hintergliedmaße ein Pulsoximeter (Nonin 8600V) angebracht. Die Körpertemperatur des Tieres wird über eine rektale Sonde über den gesamten Zeitraum der Anästhesie überwacht.

Die Narkose wird mit Atipamezol (ANTISEDAN® 0,75mg/kg KGW) und Flumazenil (ANEXATE® 0,2 mg/kg KGW) unmittelbar nach Beenden der chirurgischen Maßnahmen subcutan (s.c.) antagonisiert und die Tiere bis zum vollständigen Erwachen mit einem Heizkissen warmgehalten. Auf die Antagonisierung des Fentanyl durch Naloxon wird verzichtet, da zur postoperativen Analgesie (siehe Kapitel 3.2.3.4) Buprenorphin (TEMGESIC® 0,1mg/kg KG) verwendet wird, welches durch seine partiell antagonistische Eigenschaft das rein agonistisch wirkende Fentanyl langsam antagonisiert.



**Abb. 3 Durchführung der Intubation mit modifiziertem Kinderlaryngoskop**

Die Ratte wird dazu an den oberen Schneidezähnen an einer Spezialvorrichtung im 45°-Winkel aufgehängt.

### **3.2.3.2 Echokardiographische Messung**

Sowohl die Tiere der GFP-Gruppe (n=15), als auch die Tiere der p35-Gruppe (n=18) werden jeweils an den Tagen 0, 3 und 4 präinterventionell echokardiographisch untersucht.

Die Durchführung der sonographischen Messung erfolgt unter oben beschriebener Anästhesie und kontrollierter Beatmung. Die Tiere befinden sich dazu in Rückenlage und sind im Bereich des Sternums rasiert. Die sonographische Untersuchung wird mit einem humanmedizinischen Sonographiegerät (GE Vivid Five, 10 MHz-Sonde, Horten, Norwegen) durchgeführt. Nach Auftragen von Ultraschallkontaktgel auf den

Sternbereich wird die Sonde parallel zum Sternum aufgesetzt und das Rattenherz im Längsschnitt dargestellt.

Es werden folgende Parameter bestimmt:

Ejektionsfraktion (EF [%]) des linken Ventrikels

Die Ejektionsfraktion definiert sich aus:  $\frac{SV}{EDV}$

Schlagvolumen (SV) = (enddiastolisches Volumen – endsystolisches Volumen)  
EDV – ESV



**Abb. 4 Durchführung der echokardiographischen Untersuchung.**

Das Tier befindet sich in Rückenlage, der Schallkopf wird zur Darstellung eines linksventrikulären Längsschnittes parasternal platziert.



**Abb. 5** Echokardiographische Darstellung des linken Ventrikels.  
B-Mode, links parasternaler Längsachsenschnitt

### 3.2.3.3 Thorakotomie

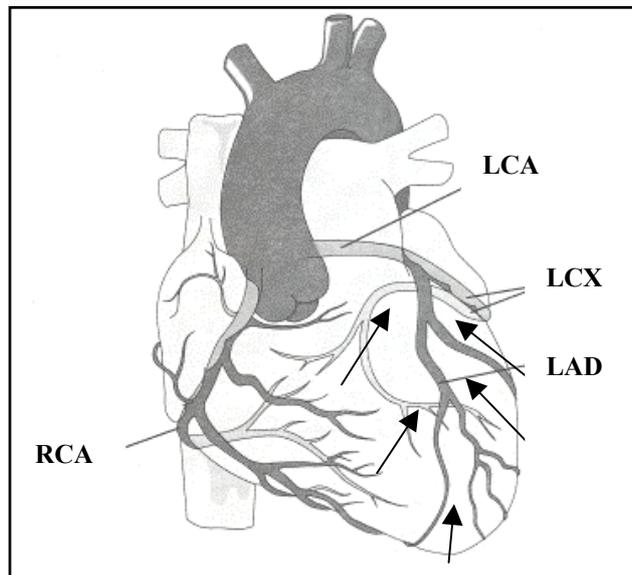
Nach Eintreten des chirurgischen Toleranzstadiums desinfiziert man die Haut an der linken Thoraxseite. Die linke Vordergliedmaße wird nach vorne ausgebunden und das Operationsfeld mit einem sterilen Lochtuch abgedeckt.

Der Hautschnitt erfolgt einen fingerbreit hinter dem kaudalen Rand der Scapula parallel zu den Rippen auf Herzhöhe in eineinhalb Zentimeter Länge. In gleicher Länge werden der M. cutaneus trunci und die im Inzisionsbereich liegenden Anteile des M. latissimus dorsi und des M. serratus ventralis thoracis durchtrennt. Nun wird der Thorax durch stumpfes Durchtrennen der Mm. intercostales zwischen der dritten und der vierten Rippe eröffnet, ein Rippenspreizer eingelegt und die Rippen auseinander gedrückt bis ein ausreichender Zugang zum Herzen besteht. Jetzt erfolgt die Virusinjektion. (s. Kap. 3.2.3.4). Nach der Virusinjektion wird die Lunge wieder in ihre ursprüngliche Lage gebracht und gebläht. Den Thorax verschließt man durch Umschlingen der dritten und vierten Rippe mit zwei Einzelheften (Nylon 4-0). Die Muskulatur wird durch eine fortlaufende Naht adaptiert (Vicryl 5-0) und die Haut mit Einzelheften verschlossen (Prolene 5-0). Die Narkose wird mit Atipamezol (ANTISEDAN® 0,75mg/kg KG), Flu-

mazenil (ANEXATE® 0,2 mg/kg KG) subcutan (s.c.) antagonisiert und die Tiere bis zum vollständigen Erwachen mit einem Heizkissen warmgehalten.

### 3.2.3.4 Adenoviraler Gentransfer

Zur Injektion des rekombinanten Adenovirus -Trägersubstanz des p35 Gens - wird der über dem Herzen liegende Lungenanteil mit einem feuchten Wattetupfer nach dorsal verlagert und das Perikard so weit eröffnet, dass ein leichtes Herauslagern des Herzens möglich wird. Die Injektion erfolgt mit einer Insulinspritze (Fa. Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden) im Apexbereich, an mehreren Stellen an der kranialateralen und kaudolateralen Myokardwand des linken Ventrikels. Die Lösung wird dabei in möglichst flachem Winkel und langsam injiziert, um eine Perfusion in das umliegende Myokardgewebe zu ermöglichen. Danach wird der Thorax mehrmals mit steriler Ringer-Lösung gespült, um die aus den Injektionsstellen ausgetretenen Reste der Viruslösung zu entfernen.



(modifiziert nach Texas Heart Institute)

**Abb. 6** Darstellung der Koronararterien und der Einstichstellen für den myokardialen Gentransfer.

LCA = Arteria coronaria sinistra (left coronary artery)

RCA = Arteria coronaria dextra (right coronary artery)

LCX = Ramus circumflexus (left circumflex artery)

LAD = Ramus interventricularis anterior (left anterior descending artery)

→ = Einstichstelle

### 3.2.3.5 Postoperative Versorgung

Zur postoperativen Analgesie erhalten die Tiere Buprenorphin (TEMGESIC® 0,1mg/kg KG) alle 12 Stunden, sowie Carprofen (RIMADYL® 5 mg/kg KG) s.c. alle 24 Stunden. Dieses Analgesieschema wird bis zum Ende des Versuches aufrechterhalten. Aufgrund der langsamen Anflutungszeit von Buprenorphin erhalten die Tiere die Primärdosis bereits 20 min vor Antagonisierung der Allgemeinanästhesie i.m. Die weitere postoperative Verabreichung des Buprenorphins erfolgt s.c. Die erste Dosis Carprofen wird bereits präoperativ s.c. verabreicht.

### 3.2.3.6 Durchführung des kardialen Ischämie-Reperfusionmodells

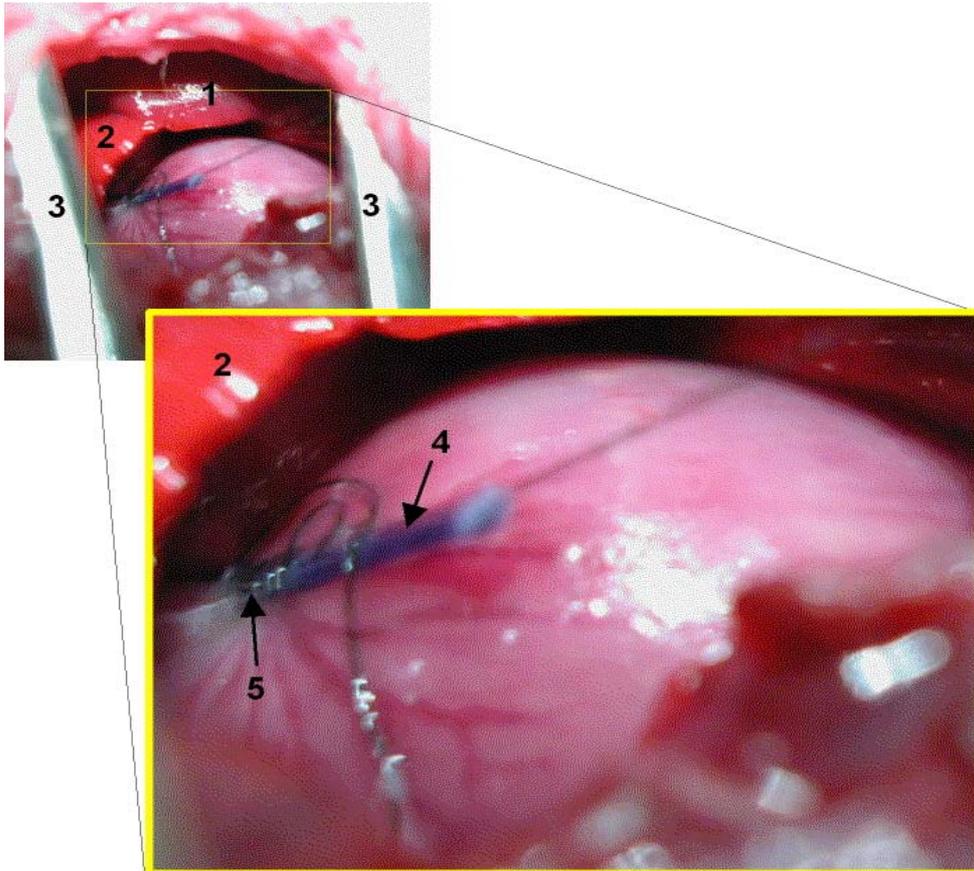
Die Induktion eines Infarktes durch koronare Ligierung wird erstmals von MEIMBURGER (1946) beschrieben.

#### **Ischämische Phase**

Die Tiere werden wie oben beschrieben narkotisiert und thorakotomiert.

Die A. interventricularis anterior wird direkt unterhalb des linken Herzohrlandes mit einem Faden (Vicryl, 6-0, TF-Nadel) umstochen. Nach Vorlegen eines doppelten chirurgischen Knotens wird ein ca. 5mm langes Fadenstück (Vicryl 0-0) untergeschoben und der Knoten über diesem Fadenstück zugezogen. Erblässen und spätere Zyanose des Myokards bestätigen das Eintreten der Ischämie. Die Ligatur wird 30 min belassen und während dieser Zeit die Körpertemperatur des Tieres konstant zwischen 36,8 °C und 37,3 °C gehalten.

Bei Auftreten von Kammerflimmern oder absoluten Arrhythmien berührt man zur Kardioversion der Rhythmusstörung mit einer sterilen Pinzette die linke Ventrikelwand. Zusätzlich werden 0,1 ml Amiodaron (CORDAREX®) auf das Herz geträufelt. Die Herzoberfläche muss während der gesamten Ischämischen Phase mit NaCl feuchtgehalten werden, um ein Austrocknen zu verhindern. Dies würde sonst zu einem Absterben der epikardialen Kardiomyozyten führen und somit eine fehlerhafte Infarktmessung zur Folge haben.



**Abb. 7**                    **Ligatur der LAD**

1 = Lunge, 2 = Herzohr, 3 = Rippenspreizer, 4 = Vicryl 0-0 Fadenstück,  
5 = Ligaturstelle mit Vicryl 6-0

### **Reperfusionphase**

Die Ligatur wird nach Herausziehen des 0-0 Fadenstücks mit einem Mikrodissektor eröffnet und somit die Reperfusion des Myokards ermöglicht. In den ersten fünf Minuten der Reperfusionphase beobachtet man am offenen Thorax die Herztätigkeit, um bei auftretenden Arrhythmien oder Kammerflimmern, wie bereits oben beschrieben, eingreifen zu können. Um spätere Verklebungen im thorakalen Raum zu verhindern, wird die Thoraxhöhle mit NaCl gespült bis keine Blutreste mehr vorhanden sind. Der Verschluss des Thorax sowie die Antagonisierung der Anästhetika geschieht wie oben beschrieben.

### **Postinterventionelle Versorgung**

Nach Antagonisierung der Allgemeinanästhesie werden die Tiere mit Auftreten des Schluckreflexes extubiert und in Brustlage gebracht. Die periphere Sauerstoffsättigung überwacht man weiterhin mit einem Pulsoxymeter. Bei Absinken der Sauerstoffsättigung unter 95 % wird die Atemluft des Tieres mit Sauerstoff angereichert.

Die analgetische Versorgung wird nach oben genanntem Protokoll (siehe 3.2.3.5) durchgeführt.

### **3.2.3. Intrakardiale Druckmessung**

#### **Gefäßpräparation und Kanülierung der A. carotis communis**

24 Stunden nach Beginn der Reperfusion werden die Tiere erneut narkotisiert, intubiert und in Rückenlage maschinell beatmet. Nach Rasur der Halsregion erfolgt durch einen Hautschnitt parallel zur Trachea die Darstellung der Halsmuskulatur. Der M. sternohyoideus wird stumpf vom M. sternomastoideus getrennt und die A. carotis dargestellt. Die A. carotis communis wird vorsichtig vom Nervus (N.) vagus abpräpariert, mit zwei Fäden angeschlungen und cranial ligiert. Eine Hilfsperson hält nun die beiden Fadenschlingen so auf Spannung, dass der Blutfluss der A. carotis im angeschlungenen Teil gestoppt ist. Nun wird die A. carotis communis mit einer Gefäßschere eröffnet.

#### **TIP-Katheter Messungen**

Ein 2F TIP-Katheter (Mikro-TIP® Transducer, Fa. Millar Instruments, Houston , Texas, USA) bis in den linken Ventrikel vorgeschoben. Der TIP-Katheter steht mit dem TIP-Messgerät (Fa. Hugo Sachs Electronics, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten) in Verbindung. Die Daten werden mit einer speziellen Software (Haemodyn® W für Microsoft ® Windows® 95/98/NT, Fa. Hugo Sachs Electronics, w.o.) erhoben und festgehalten. Die Lage des TIP-Katheters wird so lange korrigiert, bis eine gleichmäßige Druckkurve ohne Artefakte auf dem Monitor zu sehen ist. Nun wird die caudale Fadenschlinge über der A. carotis zugezogen, um den Katheter zu fixieren.

Es werden folgende Parameter erhoben bzw. errechnet:

- Systolischer Druck im linken Ventrikel (LVP sys)
- Enddiastolischer Druck im linken Ventrikel (LVP edp)
- Maximale Geschwindigkeit des Druckanstieges im linken Ventrikel (dLVP/dTmax)
- Minimale Geschwindigkeit des Druckanstieges im linken Ventrikel (dLVP/dTmin)

dLVP/dtmax und dLVP/dtmin errechnet sich aus der Druckveränderung pro Zeiteinheit.

Nach Beendigung der Messung wird der Katheter zurückgezogen und die A. carotis communis permanent ligiert.

### **3.2.3.8 Euthanasie und Probengewinnung**

Nach Abschluss der intrakardialen Druckmessung erfolgt die Euthanasie des Versuchstieres in Allgemeinanästhesie mit 300 mg Pentobarbital (Narcoren®, Fa. Rhone-Merieux GmbH, Laupheim). Sofort nach Eintritt des Todes wird das Herz mit einem möglichst lang belassenen Aortenstumpf explantiert und in kaltes, heparinisierendes NaCl gelegt.

### **3.2.3.9 Probenaufarbeitung**

Für die Darstellung des Infarktgebietes werden zwei Färbungen verwendet. So kann nicht nur die absolute Infarktgröße ermittelt werden, sondern auch der prozentuale Anteil des Infarktgebietes bezogen auf das von der Ischämie betroffene Gewebe (AR). Dabei wird die Bromphenolblaufärbung dazu verwendet, um das zum Zeitpunkt der Koronarligatur normal durchblutete Myokard (area not at risk) durch Blaufärbung von der AR zu trennen. Innerhalb der AR dient die TTC-Färbung dazu, infarziertes Gewebe und vitales Gewebe unterschiedlich darzustellen.

### **3.2.3.9.1 Durchführung der 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chlorid (TTC) -Färbung**

TTC wird seit langem benutzt, um ischämisch geschädigte Zellen in Geweben darzustellen. In gesundem Gewebe wird TTC durch oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien in einen roten, unlöslichen Farbstoff (1,3,5- Triphenylformazan) umgesetzt. Demzufolge färben sich tote Zellen oder Zellen mit gestörtem Metabolismus nicht oder deutlich weniger an (SCHLICHTING et al. 2004 und YANG et al. 1998).

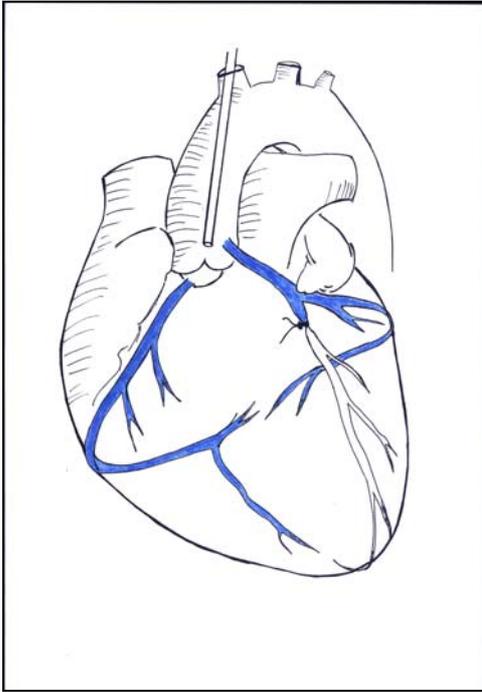
Nun wird ein Venenkatheter (VENFLON PRO, 20 GA, Fa. Becton Dickinson, Helsinborg, Schweden) über den vom Aortenstumpf abgehenden Truncus brachiocephalicus bis vor die Aortenklappe vorgeschoben und mit einem Faden (Vicryl 4-0) fixiert. Der Aortenstumpf wird dahinter mit einer Klemme abgeklemmt und das Herz mit ca. 10 ml heparinisiertem NaCl blutleer gespült. Anschließend perfundiert man mit in Phosphate-Buffered-Saline (PBS) gelöstem TTC mit einer Geschwindigkeit von 180 ml/Stunde über ca. 15 min mit einem Perfusor.

Danach wird das Herz über 5 min mit NaCl gespült, um das Präzipitieren des TTC mit dem Bromphenolblau in den Koronarien zu verhindern.

### **3.2.3.9.2 Durchführung der Bromphenolblaufärbung**

Bromphenolblau wird ursprünglich als Farbstoff zur Markierung in der Gelelektrophorese verwendet.

Zur Darstellung des Perfusionsgebiets der LAD in der ischämischen Phase und somit der „area not at risk“ des Herzens, wird die LAD an derselben Stelle wie bei der Infarktsetzung am Tag 3 religiert und die Bromphenolblaulösung von Hand über eine 5 ml Spritze in die Koronarien gespült. Dabei muss der Perfusionsdruck ausreichend hoch sein, um die Aortenklappe zu schließen, jedoch nicht so hoch, dass die Lösung über die Koronarvenen (u.a. V. cordis magna) in das Infarktgebiet läuft. Da somit der erforderliche Perfusionsdruck und auch die zu perfundierende Menge an Bromphenolblaulösung individuell variiert, ist zur besseren Steuerung eine Applikation von Hand notwendig. (siehe Abb. 8)



**Abb. 8 Durchführung der Bromphenolblaufärbung.**

Darstellung eines Herzens mit eingeführtem Katheter im Truncus brachiocephalicus. Der Katheter zur Infusion der Färbelösung wird bis kurz vor die Aortenklappe vorgeschoben, um ein Eindringen des Bromphenolblau in die Koronarien zu ermöglichen. Die LAD ist dabei religiert.

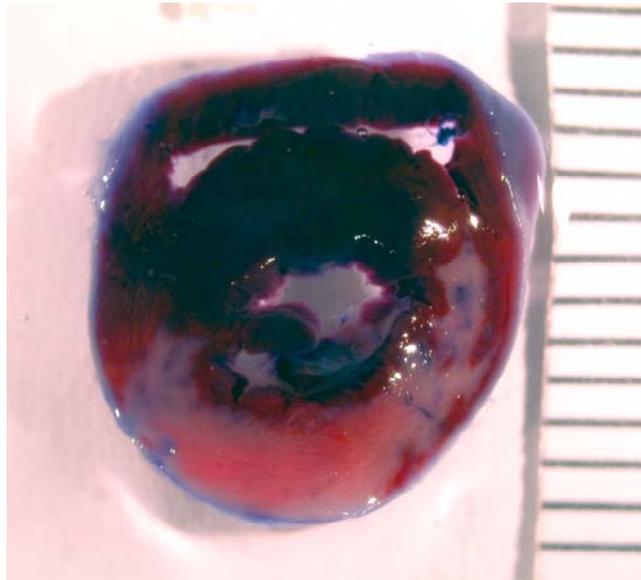
blau: Bromphenolblau

Nach Beendigung der Bromphenolblaufärbung wird der Katheter bis in das Cavum des linken Ventrikels vorgeschoben und das Herz mit ca. 5 ml NaCl gespült, um Bromphenolblaureste aus dem Cavum zu entfernen. Diese würden durch Färbeartefakte die spätere Messung verfälschen.

Das Herz wird mit einem Tupfer abgetrocknet und bis zur weiteren Bearbeitung in einem Probenröhrchen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.2.3.9.3 Schneiden des Herzens

Zuerst wird das Herz bei Raumtemperatur leicht angetaut und dann auf einer sauberen Unterlage von Hand mit einem Skalpell in 5 bis 6 ca. 1 mm dicke Scheiben geschnitten. Die Scheiben werden mit der Anschnittfläche nach oben nacheinander in aufsteigender Reihenfolge vom Apex beginnend in eine Petrischale gelegt. Um die Farbgrößen bestmöglich darzustellen, ist es notwendig, die Scheiben vollständig auftauen zu lassen. Um ein Austrocknen der Schnittoberfläche zu verhindern, wird NaCl-Lösung auf die Schnitte geträufelt.



**Abb. 9** Schnitt eines mit TTC und Bromphenolblau gefärbten Rattenherzens

blaue Färbung: zum Zeitpunkt der Infarktinduktion noch durchblutetes Gewebe (Area not at risk)  
rote Färbung: Vitales Gewebe innerhalb der Area at risk  
weiße Färbung: infarziertes Gewebe

Deutlich zu erkennen ist das rot angefärbte Gewebe innerhalb des Infarktgebietes, welches vitales Gewebe darstellt.

### 3.2.3.9 Planimetrische Auswertung

Die Schnitte werden einzeln jeweils zusammen mit einer Millimeterskala fotografiert (Nikon Cool Pix).

Die Bilder werden mit dem Programm Adobe Photoshop, Version 6.0 nachbearbeitet und archiviert und die planimetrischen Messungen mit dem Programm Scion Image, Release Beta 4.0.2 durchgeführt.

Es werden folgende Parameter ermittelt:

1. Volumen des linken Ventrikels [ $\text{cm}^3$ ]
2. Volumen der Area at risk [ $\text{cm}^3$ ]
3. Volumen des Infarktes [ $\text{cm}^3$ ]

### 3.2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgt für beide Gruppen mit SPSS 11.5 (SPSS Inc., Chicago, USA). Es werden aus den Einzelwerten jeweils der Mittelwert (MW, arithmetisches Mittel) und die Standardabweichung (SD) bestimmt.

Für die Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p$ ) wird ein Wert von  $p < 0,05$  als statistisch signifikant beurteilt, signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet.

### 3.3 Ergebnisse

#### 3.3.1 Überlebensrate

In der p35-Versuchsgruppe können 4 Tiere von 18 Tieren nicht in die Auswertung mit einbezogen werden:

Zwei Tiere sterben 48 h nach dem Gentransfer. Bei einem Tier kommt es während der Tipkathetermessung zu einer Verletzung der A. carotis communis mit Blutungen. Bei diesem Tier ist aufgrund des Blutverlustes eine standardisierte Messung des linksventrikulären Druckes nicht mehr möglich. Ein Tier verstirbt 8 h nach der Ischämiephase an Herzversagen.

In der GFP-Gruppe versterben 2 Tiere von insgesamt 15 Tieren an Herzversagen während der Ischämiephase. Ein Tier verstirbt 48 h nach dem Gentransfer.

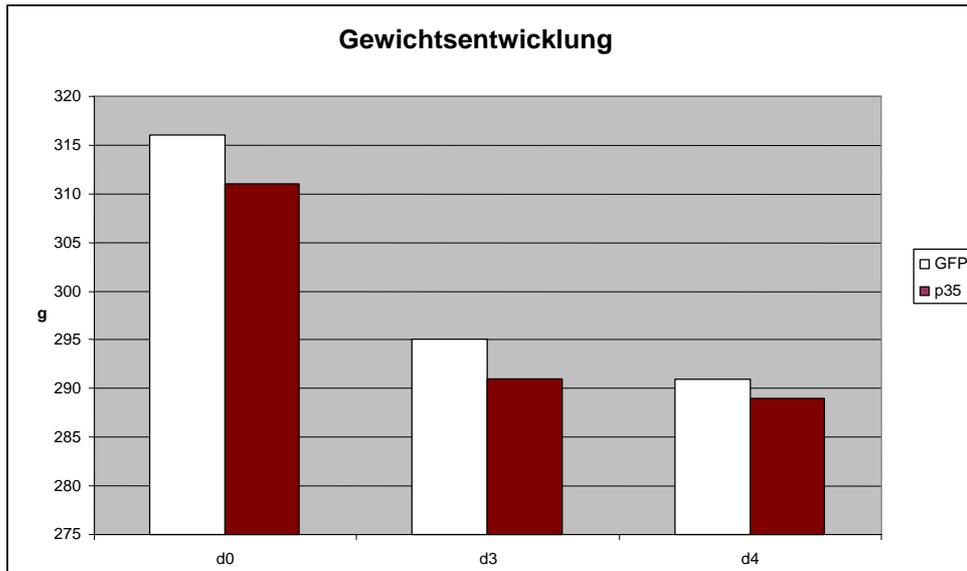
#### 3.3.2 Körpergewichtsverlauf

Die Messungen des Körpergewichtes der Tiere erfolgt an den Tag 0, 3 und 4. In der p-35 Versuchsgruppe liegen die Ausgangsgewichte präoperativ im Mittel bei 312 g, die der GFP-Versuchsgruppe bei 319 g. Bei beiden Gruppen zeigt sich die Gewichtsentwicklung im Versuchsverlauf rückläufig. Das Tiergewicht der p-35 Versuchsgruppe verringert sich im Mittel an Tag 3 auf 304 g und an Tag 4 auf 300 g. Die Tiere der GFP-Versuchsgruppe wiegen am Tag 3 im Mittel 294 g und an Tag 4 im Mittel 292 g. Zwischen den temporären Messabständen und Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied.

**Tabelle 2 Körpergewichtsverlauf der p35-Versuchsgruppe und GFP-Kontrollgruppe**

Gewichtsentwicklung						
Tiergruppe	n	M I	N	M II	n	M III
<b>p35, MW</b>	18	311	18	291	18	289
<b>SD</b>		± 4,35		± 5,34		± 5,31
<b>GFP, MW</b>	15	316	15	295	15	291
<b>SD</b>		± 6,81		± 6,40		± 6,22

p35 = p35-Versuchsgruppe, GFP = GFP-Kontrollgruppe, MI = 1. Messung, MII = 2. Messung, MIII = 3. Messung, n = Anzahl der Tiere, SD = Standardabweichung



**Abb. 10 Körpergewichtsverlauf der beiden Gruppen über den Versuchszeitraum**

GFP = GFP-Kontrollgruppe, p35 = p35-Versuchsgruppe, d = Tag

### 3.3.3 Hämodynamik

#### 3.3.3.1 Echokardiographie

Die echokardiographische Messung des linken Ventrikels wird bei 18 Tieren der p35-Gruppe und bei 15 Tieren der GFP-Gruppe vorgenommen.

Gezeigt wird der Verlauf der prozentualen, linksventrikulären Ejektionsfraktion (EF) am Versuchstag 0, 3 und 4.

Der Basalwert für die EF beträgt im Mittel für die p35-Gruppe  $56,50 \% \pm 0,45$  sowie für die GFP-Gruppe  $57,33 \% \pm 0,90$ .

Bei der zweiten Messung nach dem Gentransfer und unmittelbar vor der Infarktsetzung an Tag 3 beträgt die EF der p35-Versuchsgruppe im Mittel  $56,57 \% \pm 0,41$ , die der GFP-Versuchsgruppe  $55,81 \% \pm 0,88$ .

Bei beiden Gruppen kann kein deutlicher Unterschied zwischen den Zeitpunkten MI und MII festgestellt werden.

An Tag 4 kann man folgende Werte mit signifikanten Unterschieden feststellen:

Die EF der p35-Versuchsgruppe verringert sich auf  $50,35 \% \pm 0,76$ .

Die EF der GFP-Kontrollgruppe verringert sich auf  $46,54 \% \pm 1,18$ .

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

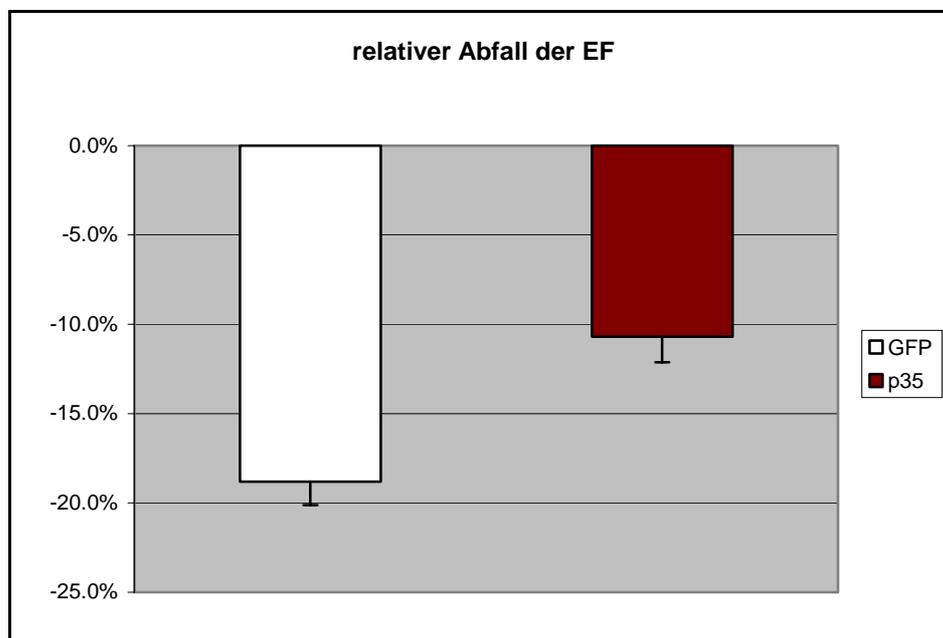
Es kann also bei beiden Gruppen eine signifikante Verminderung der EF zwischen den Zeitpunkten MII und MIII festgestellt werden.

Dabei weist die p35-Versuchsgruppe im Mittel eine signifikant höhere linksventrikuläre Ejektionsfraktion als die GFP-Versuchsgruppe auf.

**Tabelle 3 Entwicklung der linksventrikulären Ejektionsfraktion**

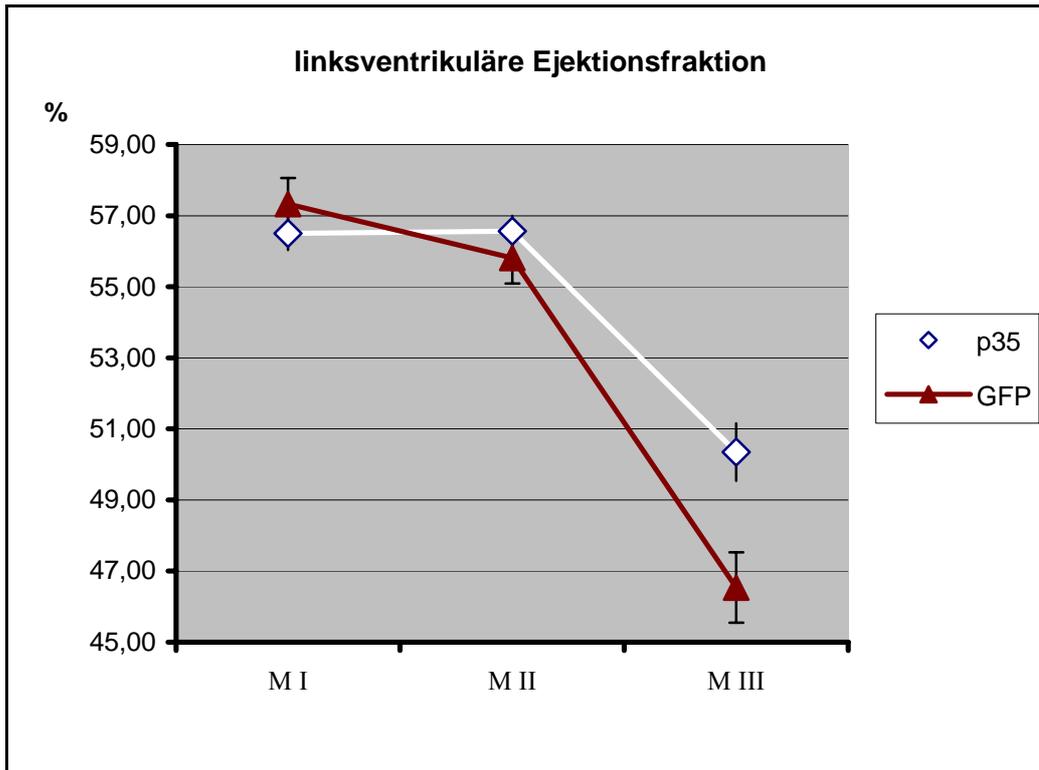
Ejektionsfraktion des linken Ventrikels (EF in %)							
Tiergruppe	n	M I	n	M II	n	M III	RA in %
<b>p35, MW</b>	18	56,5	18	56,57	18	50,53 *	11 *
<b>SD</b>		± 0,45		± 0,41		± 0,76	± 0,01
<b>GFP, MW</b>	15	57,33	15	55,81	15	46,54 *	18,8 *
<b>SD</b>		± 0,9		± 0,88		± 1,18	± 0,01
<b>p</b>						0,005	

p35 = p35-Versuchsgruppe, GFP = GFP Kontrollgruppe, M = Messung, n = Anzahl der Tiere, RA = relativer Abfall vom Ausgangswert, MW = arithmetisches Mittel, SD = Standardabweichung, \* = signifikant im Gruppenvergleich zwischen MII und MIII



**Abb. 11 Prozentualer Abfall der linksventrikulären Ejektionsfraktion vom Ausgangswert**

GFP = GFP-Kontrollgruppe im Mittel, p35 = p35-Versuchsgruppe im Mittel, p = 0,006



**Abb. 12** Entwicklung der linksventrikulären Ejektionsfraktion

M = Messung,  $p = 0,005$

### 3.3.3.2 TIP-Katheter Messung

Die linksventrikulären Druckparameter werden bei 8 Tieren der p35-Versuchsgruppe und bei 8 Tieren der GFP-Kontrollgruppe erhoben. Es werden folgende Parameter ermittelt: Der linksventrikuläre Druck während der Systole (LVP sys), der linksventrikuläre Druck während der Enddiastole (LVP edp) und die maximale bzw. minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dLVP/dt max bzw. min.). Alle Messungen werden 24h nach Infarkt durchgeführt.

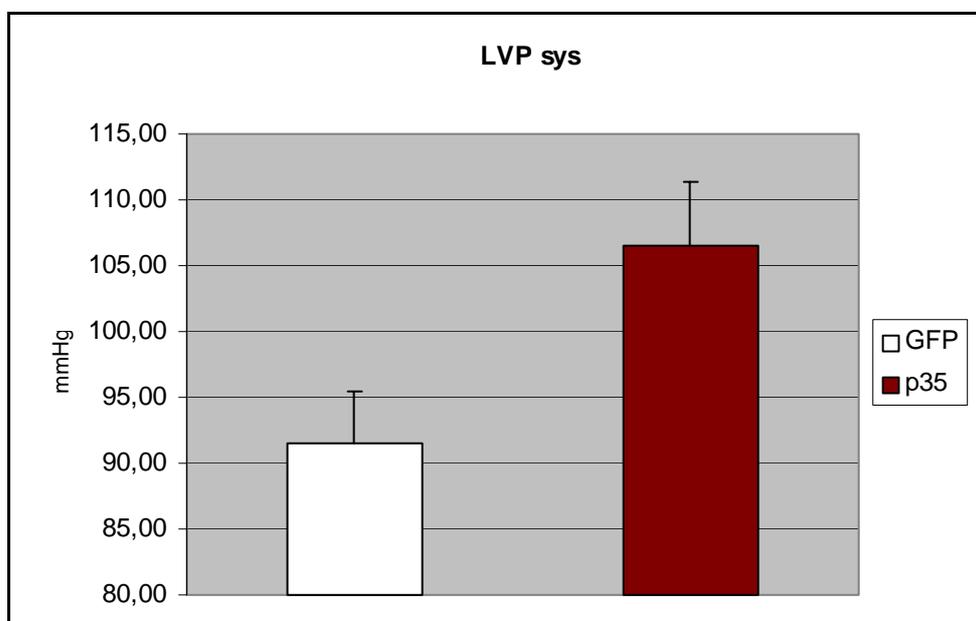
**Tabelle 4 Erhobene Daten der TIP-Katheter Messung**

		Druckparameter			
Tiergruppe	n	LVP sys	LVP edp	dLVP/dt max	dLVP/dt min
<b>p35,MW</b>	8	106,48 *	6	5659 *	-3882 *
<b>SD,</b>		4,48	3	584,8	256,43
<b>GFP, MW</b>	8	91,58 *	9,03	4634 *	-3193 *
<b>SD</b>		3,86	4	256,21	191,15
<b>p</b>		0,013	0,431	0,027	0,028

p35 = p35-Versuchsgruppe, GFP-Kontrollgruppe, n = Anzahl der Tiere,  
 LVP sys = linksventrikulärer systolischer Druck,  
 LVP edp = linksventrikulärer enddiastolischer Druck,  
 dLVP/dt max.= linksventrikuläre maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit,  
 dLVP/dt min = linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit  
 \* = signifikant im Gruppenvergleich

**Linksventrikulärer systolischer Druck (LVP sys)**

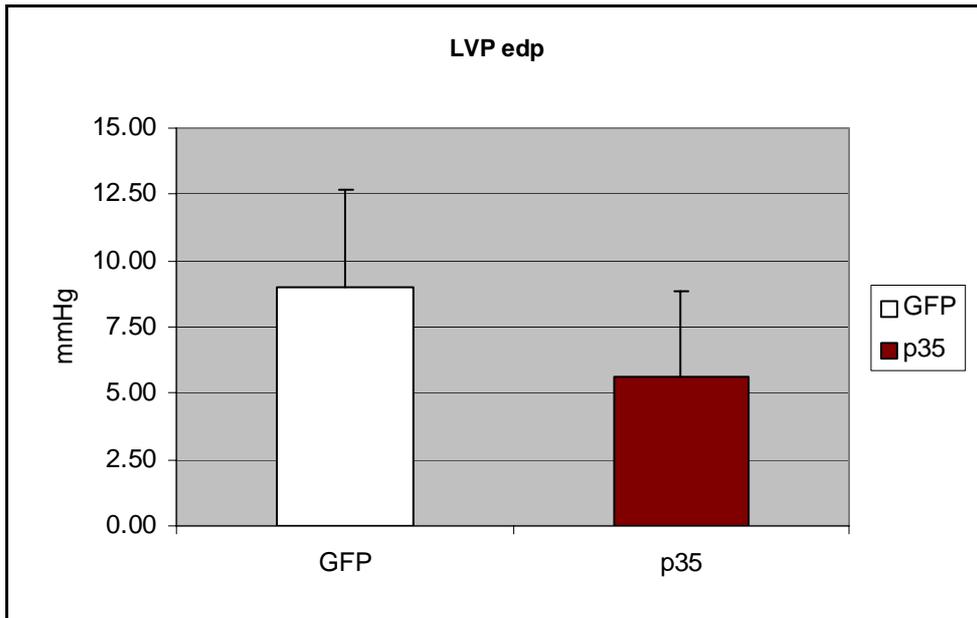
Beim Vergleich des linksventrikulären systolischen Druckes zeigt sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Der LVP sys der p35-Versuchsgruppe liegt im Mittel bei 106,48 mmHg ± 4,84, während der LVP sys der GFP-Kontrollgruppe im Mittel nur 91,58 mmHg ± 3,86 beträgt.



**Abb. 13 Linksventrikulärer systolischer Druck (LVP sys) zum Messzeitpunkt d 4**  
 GFP = GFP-Kontrollgruppe im Mittel, p35 = p35-Versuchsgruppe im Mittel, p = 0,013

### Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVP edp)

Die Auswertung des linksventrikuläre enddiastolischen Druckes ergibt beim Vergleich der p35-Versuchsgruppe mit der GFP-Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede. Der LVP edp der p35-Gruppe von  $5,60 \text{ mmHg} \pm 3,26$  im Mittel, liegt dem LVp edp der GFP-Gruppe im Mittel bei  $9,03 \text{ mmHg} \pm 3,67$ .



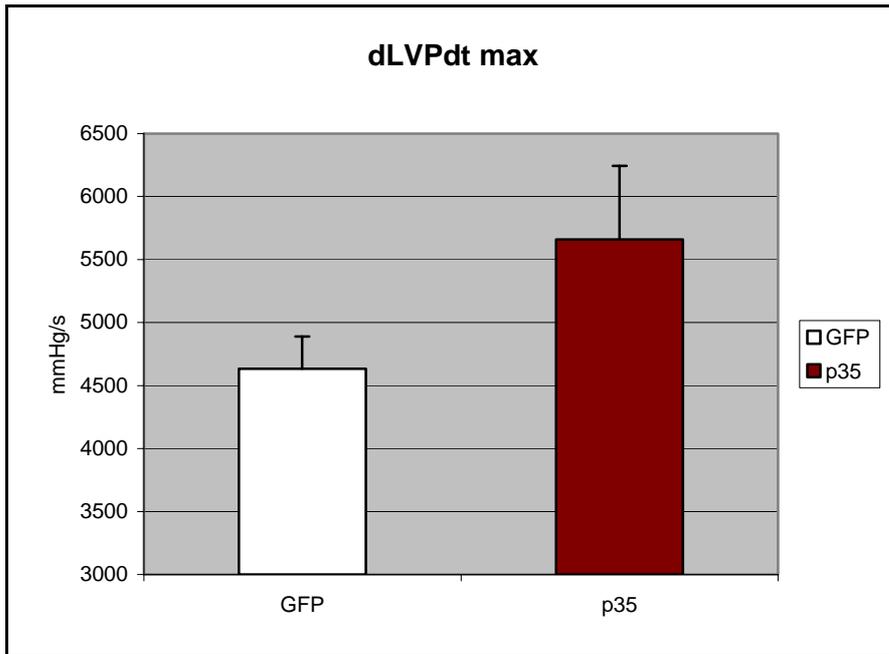
**Abb. 14** Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVP edp) zum Messzeitpunkt d 4

GFP = GFP-Kontrollgruppe im Mittel, p35 = p35-Versuchsgruppe im Mittel,  $p = 0,431$

### Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dLVP/dt max)

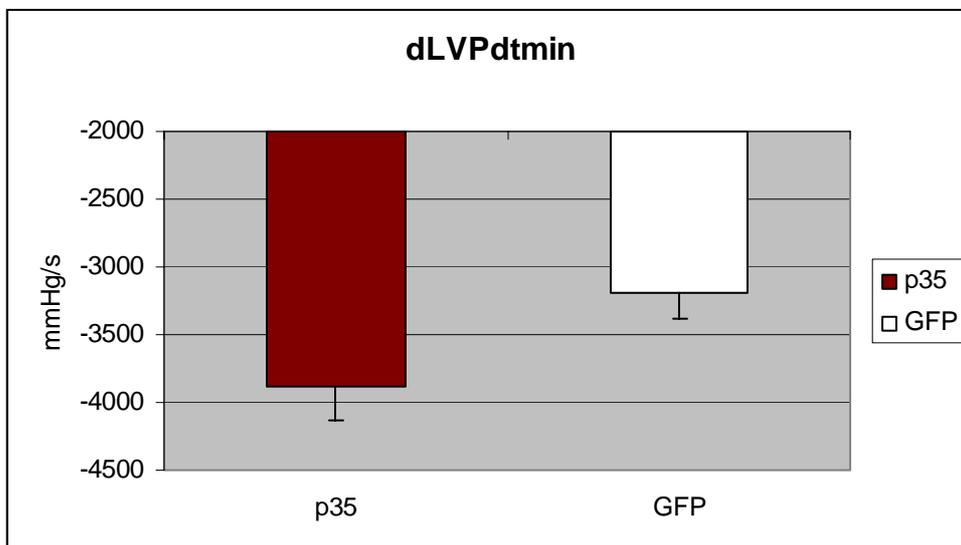
Beim Vergleich der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit (dLVP/dt max) zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Die dLVP/dt max der p35-Versuchsgruppe beträgt im Mittel  $5659 \text{ mmHg/s} \pm 584,80$ , die der GFP-Kontrollgruppe  $4634 \text{ mmHg/s} \pm 256,21$ .



**Abb. 15 Maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dLVP/dt max)**

GFP = GFP-Kontrollgruppe im Mittel, p35 = p35-Versuchsgruppe im Mittel,  $p = 0,027$



**Abb. 16 Minimale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dLVP/dt min)**

GFP = GFP-Kontrollgruppe im Mittel, p35 = p35-Versuchsgruppe im Mittel,  $p = 0,028$

### 3.3.4 Herzgewicht

Bezogen auf das Herzgewicht der Tiere können keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Das mittlere Herzgewicht der p35-Versuchsgruppe beträgt  $1,325 \text{ g} \pm 0,04$ , das der GFP-Kontrollgruppe  $1,317 \text{ g} \pm 0,06$ .

**Tabelle 5 Herzgewicht**

Herzgewicht		
Tiergruppe	n	HZG
p35, MW	15	1,325
SD		0,04
GFP, MW	11	1,317
SD		0,06

p35 = p35-Versuchsgruppe, GFP = GFP-Kontrollgruppe  
 HZG = Herzgewicht, n = Anzahl der Tiere,  
 MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

### 3.3.5 Infarktgröße

Die Infarktgröße wird in Abb. 11 in Prozent der „Area at risk“ dargestellt.

Zwischen den beiden Gruppen zeigt sich ein signifikanter Unterschied.

Bei den Tieren der GFP-Kontrollgruppe ist ein Infarktgebiet von  $17\% \pm 0,03$  messbar, während in der p35-Versuchsgruppe nur  $6\% \pm 0,03$  der „Area at risk“ Infarktgebiet darstellt.

Beim Vergleich der Größe der „Area at risk“ an sich kann gezeigt werden, dass zwischen den beiden Gruppen im Mittel kein signifikanter Unterschied besteht.

Die AR der p35-Versuchsgruppe beträgt  $1,84 \text{ cm}^3 \pm 0,16$ , die der GFP-Kontrollgruppe  $1,64 \text{ cm}^3 \pm 0,17$ .

Ebenso verhält sich die Größe des linken Ventrikels bei beiden Gruppen annähernd gleich.

Das linksventrikuläre Volumen der p35-Tiere mißt im Mittel  $2,30 \text{ cm}^3 \pm 0,10$ , die der GFP-Tiere  $2,44 \text{ cm}^3 \pm 0,11$ .

Tabelle 6 Infarktgrößenparameter der p35-Versuchsgruppe und der GFP Kontrollgruppe

Infarktgrößenparameter						
Tiergruppe	n	I	AR	LV	LV	I/AR %
p35, MW	15	0,11 *	1,84	2,30	2,30	6,0 *
SD		0,03	0,16	0,10	0,10	0,0
GFP, MW	11	0,33 *	1,64	2,44	2,44	17,00 *
SD		0,06	0,17	0,11	0,11	0,02
p		0,06	0,17	0,11		

p35 = p35-Versuchsgruppe, GFP = GFP-Kontrollgruppe,  
 n = Anzahl der Tiere, I = Infarkt, AR = Area at risk, LV = left ventricle,  
 I/AR = prozentualer Infarktanteil an der AR, MW = Mittelwert,  
 SD = Standardabweichung, \* = signifikant

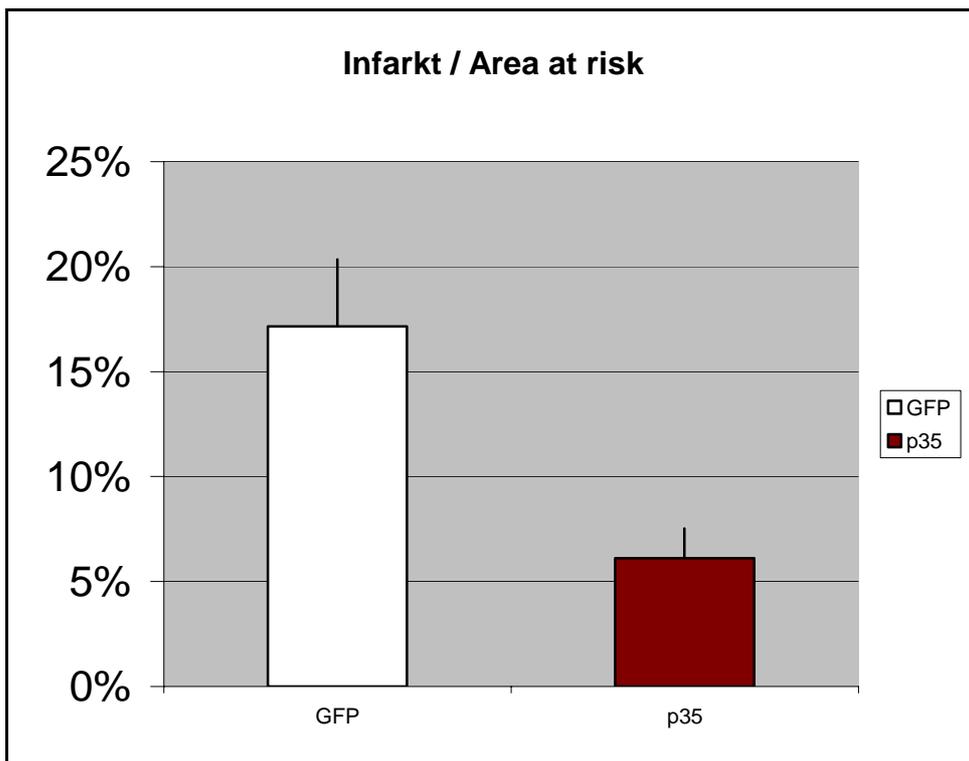
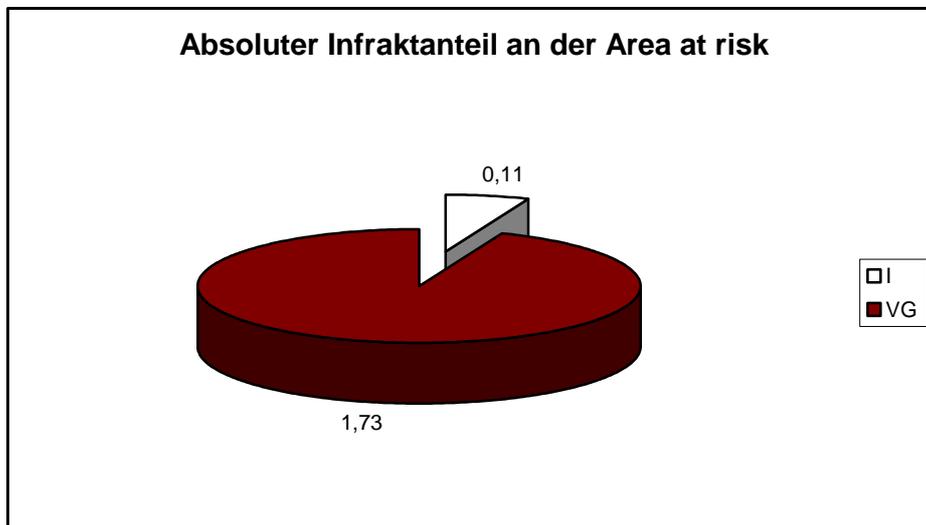


Abb. 11 Prozentualer Anteil des Infarktes an der Area at risk

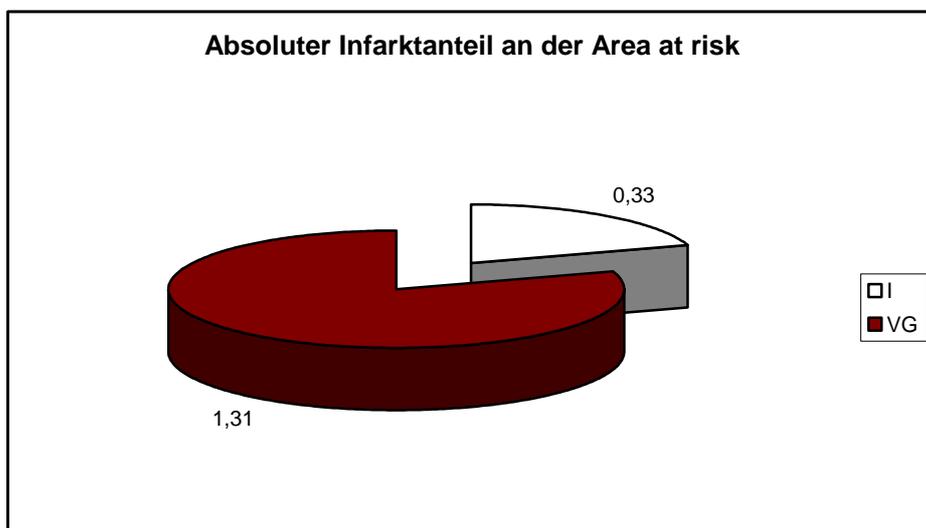
P35 = p35-Versuchsgruppe, GFP = GFP-Kontrpllgruppe, p = 0,003

Beim Vergleich der Absolutwerte der Infarktgrößen ergeben sich zwischen den beiden Gruppen ebenfalls signifikante Unterschiede. Das Infarktvolumen der p35-Gruppe liegt im Mittel bei  $0,11 \pm 0,03 \text{ cm}^3$ , das der GFP-Kontrollgruppe bei  $0,33 \pm 0,06 \text{ cm}^3$ .



**Abb. 17** Absoluter Infarktanteil der p35-Versuchsgruppe an der Area at risk in  $\text{cm}^3$

I = Infarkt in  $\text{cm}^3$ , VG = Vitales Gewebe in  $\text{cm}^3$ , I + VG = AR in  $\text{cm}^3$



**Abb. 18** Absoluter Infarktanteil der GFP-Kontrollgruppe an der Area at risk

I = Infarktgröße in  $\text{cm}^3$ , VG = Vitales Gewebe in  $\text{cm}^3$ , I + VG = AR

### 4 DISKUSSION

#### 4.1 Diskussion des Versuchsmodells

Es existieren eine Vielzahl experimenteller Tiermodelle zur myokardialen Ischämie. Ein großer Vorteil der Verwendung der Ratte als Versuchstier ist der geringere Kostenaufwand im Vergleich zu größeren Tierarten. Aufgrund der geringen Größe der Ratten sind base-line Variablen, die die Infarktgröße beeinflussen schwer zu messen. So ist z.B. das Ausmaß und die Lokalisation kollateralen Blutflusses für die Infarktgröße maßgebend.

Obwohl die koronare Blutversorgung bei der Ratte individuell variiert, ist sie für die Fragestellung geeignet, da auch die Kollateralisierung beim Menschen großen Variabilitäten unterliegt

Es muss jedoch bedacht werden, dass durch die in dieser Arbeit durchgeführte experimentelle Induktion einer regionalen Myokardischämie nicht die klinische Situation einer koronaren Okklusion und Myokardinfarkts reproduziert. Die myokardiale Ischämie wird hier durch plötzliche Okklusion der zuvor normal durchbluteten LAD hervorgerufen. Dies stellt in der Klinik eine eher seltene Ursache eines Myokardinfarktes dar. Die der Okklusion vorhergehende Verengung der Koronararterie, die Coexistenz der Erkrankung anderer Koronararterien und die langsam fortschreitende oder intermittierende Entwicklung eines intrakoronaren Thrombus wird in diesem Tiermodell nicht reproduziert.

Trotzdem ist für diese Fragestellung eine genaue Reproduktion der klinischen Situation unpassend, da für die Erprobung einer therapeutischen Strategie zur Limitierung der Infarktgröße alle Parameter wie Ischämiedauer, Körpertemperatur usw. klar definiert sein müssen.

##### 4.1.1 Adenoviraler Gentransfer

Der Einsatz eines adenoviralen Vektors für den lokalen Gentransfer am Herzen eignet sich aus verschiedenen Gründen. Adenoviren sind in der Lage sowohl proliferierende als auch ruhende Zellen, wie Kardiomyozyten zu transfizieren. Durch ihre hohe Transfektionseffizienz ist es möglich, eine hohe und stabile Expression zu erzielen (WILSON 1996).

## DISKUSSION

---

Ein zusätzlicher Vorteil besteht in der arbeitstechnisch relativ ungefährlichen Handhabung des Virus und der Möglichkeit, ihn in großen Mengen industriell hochrein herzustellen (WILSON 1996, HE et al. 1998, HAJJAR et al. 2000).

In der vorliegenden Arbeit werden replikationsdefiziente Adenoviren des Serotyps 5 mit Deletion in E1 und E3 Region verwendet. Rekombinante Viren die in der E1 und/oder der E2 Region deletiert sind, erzeugen eine erhöhte Immunantwort, da durch die Deletion die virale Antigenpräsentation nicht mehr unterdrückt wird (TORTORELLA et al. 2000).

Zur Durchführung des Gentransfers wurde in der vorliegenden Arbeit die Applikationsform der Direktinjektion gewählt, da sie einen sicheren Transfektionserfolg im Myokard gewährleistet (LIN et al. 1990). Allerdings ist diese Applikationsart mit einem hohen Aufwand verbunden da sie unter Sichtkontrolle durchgeführt werden muss. Hierzu ist eine Eröffnung des Thorax erforderlich was die therapeutische Anwendung dieser Methode erschwert. Zudem können bei den vorzeitig verstorbenen Tieren bereits nach 24 h leichte inflammatorische Reaktionen auf der Myokardoberfläche nachgewiesen werden.

Trotzdem zeigt die vorliegende Studie, dass durch Direktinjektion der Virussuspension eine Transfektion der Kardiomyozyten mit hoher Effizienz und weitgehend guter Verträglichkeit erzielt werden kann. In dieser Studie konnten die Langzeiteffekte einer kardialen Apoptosehemmung und die Langzeitfolgen einer Virusapplikation auf den Gesamtorganismus nicht untersucht werden. Nebenwirkungen durch eine nicht erwünschte Apoptosehemmung in anderen Organen sind durchaus vorstellbar. Es liegen jedoch bis heute keine Untersuchungen über die Langzeitwirkung von p35 im Organismus vor.

GFP wird seit langem in zahlreichen Studien als Marker für positiv transfizierte Zellen verwendet. Ein kritischer Punkt jedoch ist die Zytotoxizität von GFP. Mit zunehmendem Expressionslevel werden GFP-transfizierte Zellen apoptotisch (LIU et al. 1999). Trotzdem sind die Ergebnisse der vorliegenden Studie von dieser Tatsache unbeeinflusst, da der Expressionslevel von GFP so niedrig wie möglich gehalten wird und sowohl der Vektor der Kontrollgruppe als auch der Versuchsgruppe GFP enthält.

### 4.2 Diskussion der Ergebnisse

#### 4.2.1 Überlebensrate

Von den insgesamt 33 untersuchten Tieren verstarben 7 Tiere während des Versuchszeitraumes. 3 Tiere verstarben 48 h nach dem Gentransfer; davon stammen 2 Tiere aus der p35-Versuchsgruppe und 1 Tier aus der GFP-Kontrollgruppe. Durch die Deletion der E1 und E3 Region des Adenovirus wird die virale Antigenpräsentation nicht mehr unterdrückt. Dies hat zur Folge, dass die Applikation des adenoviralen Vektors eine weitaus stärkere Immunantwort im Organismus hervorrufen kann als eine Infektion mit unveränderten Adenoviren (TORTORELLA et al. 2000, ROTH 2002).

Es kann somit eine immunologische Reaktion als Ursache für das Versterben der Tiere vor Versuchsende in Erwägung gezogen werden. Von den 7 verstorbenen Tieren aus der p35-Versuchsgruppe wurde bei einem Tier eine Magendehnung und massenhaft Streu im Magen-Darm-Trakt festgestellt. Das Versterben dieses Tieres ist auf die Folgen der bei Ratten nach der Applikation von Buprenorphin auftretenden „pica behavior“ („consumption of non nutritive substances“) zurückzuführen (CLARK et al. 1997)

Das zur p-35 Versuchsgruppe gehörende, an der A. carotis verletzte Tier wird nicht in die Auswertung einbezogen, da aufgrund des aufgetretenen Blutverlustes eine standardisierte Druckmessung nicht mehr möglich ist. Zudem wäre bei der Infarktauswertung mit Fehlern zu rechnen, da durch ein zu geringes Blutvolumen Kardiomyozyten zugrunde gehen können.

#### 4.2.2. Körpergewichtsverlauf

Insgesamt kommt es bei beidem Gruppen zu einer generellen Gewichtsabnahme während des Versuchszeitraumes. Die Gewichtsentwicklung der Tiere ist jedoch differenziert zu betrachten, da mehrere verschiedene Komponenten das Körpergewicht beeinflussen können. So ist beispielsweise denkbar, dass die chirurgische Intervention an sich und nicht der Einfluss des p35 die Gewichtsabnahme hervorruft, da die Tiere weniger Futter zu sich nehmen. Es treten allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf.

### 4.2.3 Funktionelle Herzparameter

Während des 4tägigen Versuchszeitraumes werden die Tiere insgesamt dreimal echokardiographisch untersucht wobei jeweils die Ejektionsfraktion bestimmt wird. Dies ermöglicht eine Aussage über den Einfluss der Apoptose-hemmenden Eigenschaft von p35 auf die Herzfunktion. Es kann bei der p35-Versuchsgruppe im Mittel eine signifikant bessere Ejektionsfraktion gemessen werden als bei der GFP-Kontrollgruppe. Interessant ist die Tatsache, dass die Ejektionsfraktion der p35-Versuchsgruppe bereits vor der Infarktinduktion am Versuchstag 3 höher ist als in der GFP-Kontrollgruppe. Auch wenn dieser Unterschied nicht signifikant ist, wäre eine Blockierung der durch GFP ausgelösten Apoptose durch p35 in der Versuchsgruppe vorstellbar.

Die Verwendung der Echokardiographie zur Messung funktioneller Herzparameter am Rattenherzen wird in der Literatur häufig beschrieben und stellt auch in der Humanmedizin den Standard zur Messung kardialer Anatomie und Funktion dar. Die Ejektionsfraktion des gesunden Rattenherzens sind der des gesunden Menschenherzens entsprechend. Die am Rattenherzen erhobenen echokardiographischen Daten sind somit gut auf den Menschen übertragbar (WATSON et al. 2004).

Die p35-Versuchsgruppe wie auch die GFP-Kontrollgruppe werden am Tag 4 einer Tip-Katheter Messung unterzogen. Die Körpertemperatur aller Tiere wird während der Messung zwischen 36,8 °C und 37 °C gehalten. Um Messungenauigkeiten zu vermeiden wird der Tip-Katheter genau auf die Körpertemperatur des Tieres geeicht.

Bei der Präparation der A. carotis ist genau darauf zu achten, den N. vagus nicht zu berühren oder zu dehnen, da dies zu drastischen Änderungen der Herzfrequenz und damit auch der Druckparameter im linken Ventrikel führen kann. Da die Tiere nicht im Wachzustand gemessen werden können zeigt sich der Einfluss der Narkose auf die kardialen Messparameter als kritischer Punkt. Zwar werden die Anästhetika streng nach Körpergewicht der Tiere dosiert, jedoch ist eine individuell unterschiedliche Reaktion der herzinsuffizienten Tiere auf die Anästhetika anzunehmen. Die Messung von Druckparametern im linken Ventrikel mittels Tip-Katheter gilt als sensible gut anwendbare Methode bei kleinen Labortieren (ZIMMER 1983).

Insgesamt beweisen die Ergebnisse der Tip-Katheter und der echokardiographischen Messung eine verbesserte myokardiale Funktion. Da bestimmte Bestandteile des kontraktile Apparates der Zellen, wie beispielsweise Gelsolin, zu den Zielstrukturen

der Caspasen gehören, lässt sich daraus schließen, dass durch eine p35-induzierte Caspase-Hemmung die Kontraktilität der Kardiomyozyten erhalten werden kann. Wie die von BAUMGARTNER (2002) durchgeführten Untersuchungen an Einzelkardiomyozyten demonstrieren, trägt eine effektive Hemmung der Caspasen wesentlich zur Erhaltung des kontraktiven Apparates des Kardiomyozyten bei.

PERRIN et al. (2003) zeigen in einem Langendorff-Modell, dass durch DEVD (ein pharmakologischer Caspaseinhibitor) die Infarktgröße im Rattenherzen reduziert wird. Sie können jedoch keine Verbesserung der post-ischämischen myokardialen Funktion nachweisen. Dies könnte damit zusammenhängen, dass p35 außer seiner inhibitorischen Wirkung auf Caspasen auch „reactive oxygen species“ (ROS) blockiert. ROS können durch Hochregulierung von proapoptotischen Proteinen, wie bax, den Caspasen und durch Auslösung der mitochondrialen Caspase-Kaskade Apoptose im Kardiomyozyten auslösen (KUMAR und JUGDUTT 2003). DEVD als pharmakologischer Caspaseinhibitor besitzt diese Eigenschaft nicht und blockiert außerdem lediglich Caspase 3. Dies könnte bedeuten, dass p35 durch Blockierung mehrerer Caspase-auslösender Faktoren eine effizientere Apoptoseinhibition als DEVD bewirkt und damit auch eine messbare Verbesserung der Herzfunktion erzeugt.

Die Frage, ob die verbesserte kardiale Kontraktionskraft in der p35-Versuchsgruppe über einen längeren Zeitraum erhalten bleibt, ist in dieser Studie nicht zu beantworten. Es gilt beispielsweise abzuklären, ob eine Unterbindung des apoptotischen Ablaufs im Kardiomyozyten einen nichtapoptotischen Zelltod zur Folge hat (GUSTAFSSON und GOTTLIEB 2003).

#### **4.2.4 Infarktgröße**

Die koronare Ligierung stellt das am häufigsten verwendete Modell zur Erzeugung experimenteller myokardialer Infarkte bei der Ratte dar (SPADARO et al. 1980).

Trotzdem wird es in der Literatur kritisch diskutiert. CIULLA et al. (2004) beschreiben die Lokalisation und Größe des Infarktgebietes als variabel. Zwar erwies sich die Lokalisation des Infarktgebietes in der vorliegenden Studie ebenfalls als variabel, jedoch konnten bezüglich der Infarktgröße innerhalb einer Gruppe keine großen

Schwankungen festgestellt werden. Zudem erwies sich sogar die AR als durchaus konstante Größe. Es ist somit möglich mit dem angewendeten Ischämie/Reperfusionen Modell ein konstant großes ischämisches Gebiet zu induzieren.

Allerdings bleibt kritisch zu diskutieren, dass die Lokalisation des Infarktgebietes für die Herzfunktion von Bedeutung ist. Die Variabilität des Infarktgebietes erklärt sich durch die koronare Anatomie des Rattenherzens. Das Septum wird von einem Seitenast versorgt, der sehr nahe am Ursprung der linken Koronararterie entspringt und somit schwierig oder sogar unmöglich zu ligieren ist (SPADARO et al. 2004). Dieser Beobachtung entsprechend konnte in der vorliegenden Studie kein septaler Infarkt festgestellt werden.

CIULLA et al. (2004) beschreiben zusätzlich unterschiedliche Nekrosemuster und einen variablen Heilungsprozess des Infarktes.

### 4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Studie demonstriert, dass durch Anwendung des Ischämie/-Reperfusionenmodells ein myokardialer Infarkt am Rattenherzen erfolgreich induziert werden kann. Daraus ergibt sich die Möglichkeit zur Untersuchung der genterapeutischen Intervention einer Apoptosehemmung durch p35.

Wie auch schon in anderen Studien dargestellt, zeigt auch die vorliegende Arbeit, dass durch die Caspase-hemmende Eigenschaft von p35 apoptotischer Zelltod in den Kardiomyozyten *in vivo* blockiert werden kann. Zudem konnten neue Erkenntnisse bezüglich der Beeinflussung der funktionellen Herzleistung durch die Caspasehemmung gewonnen werden.

Die Tiere der p35-Versuchsgruppe zeigen nicht nur kleinere Infarktgrößen als die Tiere der GFP-Kontrollgruppe, sondern auch eine bessere Herzfunktion und Hämodynamik. Wie die von BAUMGARTNER (2002) durchgeführten Untersuchungen an Einzelkardiomyozyten bereits zeigen, beweist somit auch die vorliegende Studie eine verbesserte Herzfunktion unter dem Einfluss der Caspase-hemmenden p35-Intervention. Dies bedeutet, die Möglichkeit einer Verbesserung der gesamten Herz-Kreislauf-Funktion und damit auch der Lebensqualität von Infarktpatienten. Die Applikationsform der Direktinjektion 3 Tage vor Infarkt am offenen Thorax stellt keinesfalls einen neuen Therapieversuch dar. Die vorliegende Studie soll lediglich im Sinne eines "proof of

principle", die hohe Wirksamkeit einer Apoptosehemmung durch p35 und damit die Möglichkeit sowohl einer Infarktgrößenreduktion als auch einer Verbesserung der Herzfunktion demonstrieren.

Kritisch zu betrachten ist die Frage, ob die Verbesserung der kardialen Funktion über einen längeren Zeitraum erhalten bleibt oder möglicherweise ein langsam ablaufender nicht-apoptotischer Zelltod die Folge einer Apoptosehemmung im Kardiomyozyten ist (GUSTAFSSON und GOTTLIEB 2003). Dies könnte bedeuten, dass durch eine Unterbindung des apoptotischen Zelltodes durch eine p35-Intervention die kardiale Situation zwar kurzfristig verbessert werden kann, langfristig aber eine größere Gewebedegeneration zur Folge hat. Diese Frage könnte durch entsprechende Langzeitstudien geklärt werden.

Wie bereits vielfach in der Literatur beschrieben, zeigt auch die vorliegende Arbeit, dass durch direkte myokardiale Applikation eines rekombinanten adenoviralen Vektors eine effiziente Transfektion der Kardiomyozyten in 2/3 des linksventrikulären Myokards erreicht werden kann. Allerdings hat die notwendige Deletion in der E1- und E3-Region des adenoviralen Vektors durch die Auslösung einer verstärkten Immunantwort nicht zu unterschätzende Nebenwirkungen zur Folge (TORTORELLA et al. 2000, ROTH 2002).

Außerdem bringt das Fehlen der Gewebsspezifität des adenoviralen Vektors und die fehlende Möglichkeit zur Regulation der Genexpression Nachteile mit sich (MIZUGUCHI 2003). So kann die kardiale Applikation von viralen Vektoren zu deren Anreicherung in Leber und Milz führen. Erhöhte Leberwerte bei adenoviral transfizierten Tieren sind erwiesen (BAUMGARTNER 2002, EVERETT et al. 2003).

In folgenden Studien sollte vor allem die Applikationsform von Vektoren weiterentwickelt werden, sowie neue Methoden des Gentransfers wie beispielsweise "Microbubbles" und die Verwendung von adenoviralen Vektoren der nächsten Generation untersucht werden. Durch die Erprobung von lang exprimierenden Vektoren wie die adeno-assoziierten Viren, könnten neue Erkenntnisse über die Effekte einer länger andauernden antiapoptotischen p35-Intervention gewonnen werden.

### 5 ZUSAMMENFASSUNG

In zahlreichen *In-vitro*-Studien konnte bisher gezeigt werden, dass das baculovirale Protein p35 Apoptose in Zellen blockieren kann. Weiterhin konnte durch *Ex-vivo*-Experimente am Langendorff-Apparat eine Reduktion der Infarktgröße im Rattenherzen durch eine p35 Intervention nachgewiesen werden. Das Ziel der vorliegenden Studie ist die *In-vivo*-Untersuchung der durch p35 induzierten Apoptosehemmung in Bezug auf die Infarktgröße und darüber hinaus auf die Funktionalität des Herzens. Der Infarkt bei den im Versuch verwendeten Tieren wird durch 30-minütige Ligierung der LAD mit anschließender Reperfusion über 24 h hervorgerufen.

Im Rahmen dieser Studie werden folgende Untersuchungen während des Versuchszeitraumes durchgeführt: Echokardiographie, linksventrikuläre Druckmessung (LVPSys, LVPedp, dLVP/dtmax, dLVP/dtmin), planimetrische Bestimmungen (Infarktgröße, AR, I/AR). Die erhobenen echokardiographischen Daten ergaben für die p35-Versuchsgruppe (n=18) gegenüber der Kontrollgruppe (n=15) eine signifikant bessere Ejektionsfraktion (EF: p35-VG 50,35 %  $\pm$  0,76, GFP-KG 46,54 %  $\pm$  1,18). Auch die gemessenen linksventrikulären Druckparameter zeigen bis auf LVPedp eine signifikante Verbesserung der Hämodynamik (LVPSys: p35-VG 106,48 mmHg  $\pm$  4,48, GFP-KG 91,58 mmHg  $\pm$  3,86, dLVP/dtmax: p35-VG 5659 mmHg/s  $\pm$  584,8, GFP-KG 4634 mmHg/s  $\pm$  256,21, dLVP/dtmin: p35-VG -3882 mmHg/s  $\pm$  256,43, GFP-KG -3193 mmHg/s  $\pm$  191,15). LVPedp erwies sich mit 6 mmHg  $\pm$  3 in der p35 VG und 9,03 mmHg  $\pm$  4 in der KG als nicht signifikant unterschiedlich.

Bezogen auf das Herzgewicht werden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt. Das mittlere Herzgewicht der mit p35 transfizierten Tiere ergibt 1,325 g  $\pm$  0,04. Die Tiere der Kontrollgruppe liegen mit einem Herzgewicht von 1,317 g  $\pm$  0,06 annähernd gleich.

Ex-vivo kann am p35 transfizierten Herzen im Gegensatz zu den Kontrolltieren eine signifikante Reduktion der Infarktgröße bei konstanter AR festgestellt werden. Die absolute Infarktgröße beträgt bei den Tieren der p35-Versuchsgruppe im Mittel 0,11 cm<sup>3</sup>  $\pm$  0,03 und bei den Tieren der GFP-Kontrollgruppe 0,33 cm<sup>3</sup>  $\pm$  0,06. Auch der prozentuale Anteil des Infarktes an der Area at risk zeigt sich bei den Tieren der p35-Versuchsgruppe mit 6%  $\pm$  0,0 gegenüber den Kontrolltieren mit 17%  $\pm$  0,02 reduziert. Die vorliegende Studie zeigt demzufolge, dass Apoptosehemmung durch adenoviralen Gentransfer von p35 am infarzierten Rattenherzen zu einer Reduktion der

## ZUSAMMENFASSUNG

---

Infarktgröße und darüber hinaus zu einer signifikanten Verbesserung der Herzleistung führt. Dies beweist, dass eine effektive Hemmung der Caspasen zur Erhaltung des kontraktilen Apparates der infarzierten Kardiomyozyten beiträgt. Es besteht somit die Möglichkeit, nicht nur das Überleben von Kardiomyozyten im myokardialen Infarktgeschehen zu sichern, sondern auch deren Funktionalität zu erhalten.

## 6 SUMMARY

**Effect of apoptosis-inhibition by protein p35 on hemodynamics and infarct size in a rat myocardial infarct model**

Numerous *in vitro* studies showed the ability of the baculoviral protein p35 to effectively inhibit apoptosis in cells. Furthermore *ex vivo* Langendorff-experiments proved a reduction of infarct size by p35-intervention. The aim of the present study is to investigate the p35 dependent inhibition of apoptosis after adenoviral gene transfer into the myocardium with respect to infarct size as well as to cardiac function and hemodynamics.

Myocardial infarction is induced by ligation of the left anterior descending artery (LAD) for 30 minutes followed by a 24 h reperfusion period. The following measurements are performed during the examination period: echocardiography (EF), left ventricular pressure measurement (LVPsys, LVPedp, dLVP/dtmax, dLVPdtmin), planimetry (infarct size, AR, I/AR). The evaluated echocardiographical data show a significant improvement of ejection fraction (EF: p35-G 50,35%  $\pm$  0,76, GFP-CG 46,54  $\pm$  1,18) in the p35-group (n=18) in comparison to the control group (n=15). Likewise left ventricular pressure parameters showed a significant improvement except for LVPedp which was not significantly different. (LVPsys: p35-G 106,48 mmHg  $\pm$  4,48, GFP-CG 91,58 mmHg  $\pm$  3,86, LVPedp: p35-G 6 mmHg  $\pm$  3, GFP-CG 9,03 mmHg  $\pm$  4, dLVP/dtmax: p35-G 5659 mmHg/s  $\pm$  584,8, GFP-CG 4634 mmHg/s  $\pm$  256,21, dLVP/dtmin: p35-G -3882 mmHg/s  $\pm$  256,43, GFP-CG -3193 mmHg/s  $\pm$  191,15).

No significant difference was seen for the mean heart weight of the p-35 group measured 1,325 g  $\pm$  0,04 compared to the mean heart weight of 1,317 g  $\pm$  0,06 in the GFP-control group.

In agreement with previous studies infarct size showed a significant reduction in the p35 transfected hearts, in opposition to the control animals with AR remaining constant in both groups. (Absolute infarct size: p35-G 0,11 cm<sup>3</sup>  $\pm$  0,03, GFP-CG 0,33 cm<sup>3</sup>  $\pm$  0,06, I/AR %: p35-G 6%  $\pm$  0,0, GFP- CG 17%  $\pm$  0,02).

The present study demonstrates that inhibition of apoptosis after adenoviral gene transfer of p35 reduces infarct size, and further improves cardiac function in a rat model of myocardial infarction. This confirms that Caspase-inhibition helps to maintain the

## SUMMARY

---

function of the contractile apparatus in infarcted Cardiomyocytes. Thus, not only securing survival, but maintaining the function of Cardiaomyocytes in myocardial infarction.

### 7 LITERATURVERZEICHNIS

ALVAREZ RD, GOMEZ-NAVARRO J, WANG M, BARNES MN, STRONG TV, ARANI RB, ARAFAT W, HUGHES JV, SIEGAL GP, CUIEL DT (2000)

Adenoviral-mediated suicide gene therapy for ovarian cancer.

Mol Ther, 2:524-530

ANVERSA P, CHENG W, LIU Y, LERI A, REDAELLI G, KAJUSTRA J (1998)

Apoptosis and myocardial infarction.

Basic R Cardiol, 93, Suppl. 3: 8-12

BAKER HJ, LINDSEY SH, WEISBROTH SH (1980)

The laboratory rat. (scientific foundations).

Volume II, Kapitel 8, S.164

BARNETT BG, TILLMAN BW, CUIEL DT, DOUGLAS JT (2002)

Dual targeting of adenoviral vectors at the levels of transduction and transcription enhances the specificity of gene expression in cancer cells.

Mol Ther, 6: 377-385

BARTLING B, HOLTZ J, DARMER D (1998)

Contribution of myocyte apoptosis to myocardial infarction?

Basic R Cardiol, 93 (2): 71-84

BAUMGARTNER C (2002)

Myokardiale Apoptosehemmung durch adenoviralen Gentransfer von p35 zur Steigerung der kardialen Kontraktionskraft im insuffizienten Kaninchenherz.

Vet Med Diss, München

BEIDLER DR, TEWARI M, FRIESEN PD, POIRIER G, DIXIT VM (1995)

The baculovirus p35 protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis.

J Biol Chem, 270: 16526-16528

## LITERATURVERZEICHNIS

---

BERTIN J, MENDRYSA SM, LACOUNT DJ, GAUR S, KREBS JF,  
ARMSTRONG RC, TOMASELLI KJ, FRIESEN PD (1996)

Apoptotic suppression by baculovirus p35 involves cleavage by and inhibition of a  
virus-induced CED-3/ice-like protease.

J Virol, 9: 6251-6259

BRAND K, ARNOLD W, BARTEL S, LIEBER A, KAY MA, STRAUSS M,  
DORKEN B (1997)

Liver-associated toxicity of the HSV-tk/GCV.

Cancer Gene Ther. 4: 9-16

BRAUNWALD E, BRISTOW MR (2000)

Congestive heart failure: fifty years of progress.

Circulation, 102 (20 Suppl. 4): IV 14-23

BROWN R (1996)

The Bcl-2 family of proteins

Br Med Bull, 53: 466-477

BUCKLEY IK(1972)

A light and electron microscopic study of thermally injured cultured cells

Lab Invest, 26: 201-209

BUMP NJ, HACKET M, HUGUNIN M, SESHAGIRI S, BRADY K, CHEN P,  
FERENZ C, FRANKLIN S, GHAYUR T, LI P, LICARI P, MANKOVICH J, SHI L,  
GREENBERG AH, MILLER LK, WONG WW (1995)

Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35.

Science, 269: 1885-1888

CERETTI DP, KOZLOVSKY CJ, MOSLEY B, NELSON N, VAN NESS K,  
GREENSTREET TA, MARCH CJ, KRONHEIM SR, DRUCK T, CANNIZZARO LA,  
HUEBNER K, BLACK RA (1992)

Molecular cloning of the interleukin 1- $\beta$  converting enzyme.

Science, 256: 97-100

## LITERATURVERZEICHNIS

---

CHENG EH, KIRSCH DG, CLEM RJ, RAVI R, KASTAN MB, BEDI A, UENO K, HARDWICK JM (1997)

Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases.

Science, 278: 1966-1968

CIULLA MM, PALIOTTI R, FERRERO S, BRAIDOTTI P, ESPOSITO A, GIANELLI U, BUSCA G, CIOFFI U, BULFAMANTE G, MAGRINI F (2004)

Left ventricular remodelling after experimental myocardial cryoinjury in rats.

J Surg Res, 116: 91-97

CLARK MG, PATTEN GS (1984)

Adrenergic control of phosphofructokinase and glycolysis in rat heart.

Curr Top Cell Regul, 23: 127-176

CLARK JA Jr, MYERS PH, GOELZ MF, THIGPEN JE, FORSYTHE I (1997)

Pica behaviour associated with buprenorphine administration in the rat.

Lab Anim Sci, 47: 300-303

CLEM RJ, FECHHEIMER M, MILLER LK (1991)

Prevention of apoptosis by baculovirus gene during infection of insect cells.

Science, 254: 1388-1390

CLEM RJ, MILLER LK (1994)

Control of programmed cell death by the baculovirus genes p35 and iap.

Mol Cell Biol, 14: 5212-5222

COLUCCI W (1996)

Apoptosis in the heart.

N Engl J Med, 335: 1224-1226

CRYNS V, YUAN J (1998)

Proteases to die for.

Genes Dev, 12: 1551

## LITERATURVERZEICHNIS

---

CRYSTAL RG, HIRSCHOWITZ E, LIEBERMAN M, DALY J, KAZAM E, HENSCHKE C; YANKELEVITZ D, KEMENY N, SILVERSTEIN R, OHWADA A, MASTRANGELI A, SANDERS A, COOKE J, HARVEY BG (1997)

Phase I study of direct administration of a replication deficient adenovirus vector containing the E. coli cytosine deaminase gene to metastatic colon carcinoma of the liver in association with the oral administration of the pro-drug 5-fluorocytosine.

Hum Gene Ther, 20: 985-1001

DEVERAUX OL, TAKAHASHI R, SALVESEN GS, REED JC (1997)

X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases.

Nature, 388(6639): 300-304

DEVERAUX OL, ROY N, STENNICKE HR, VAN ARSDALE T, ZHOU Q, SRINIVASULA SM, ALNEMRI ES, SALVESEN GS, REED JC (1998)

IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases.

EMBO J, 17(8): 2215-2223

DIVE C, WATSON JV, WORKMAN P (1990)

Multiparametric analysis of cell membrane permeability by two colour flow cytometry with complementary fluorescent probes.

Cytometry, 11(2): 244-252

DONEHOVER LA, HARVEY M, SLAGLE BL (1992)

Mice deficient for p35 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors.

Nature, 356: 215-221

DROIN N, BEAUCHEMIN M, SOLARY E, BETRAND R (2000)

Identification of Caspase-2 isoform that behaves as an endogenous inhibitor of the caspase cascade.

Cancer Res, 60: 7039-7047

EARNSHAW WC (1995)

Nuclear changes in apoptosis.

Curr Opin Cell Biol, 7: 337-343

ENARI M, SAKAHIRA H, YOKOYAMA H, OKAWA K,

IWAMATSU A, NAGATA S (1998)

A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis,  
and its inhibitor ICAD.

Nature, 391: 43-50

EVERETT RS, HODGES BL, DING EY, XU F, SERRA D,

AMALFITANO A (2003)

Liver toxicities typically induced by first-generation adenoviral vectors can be reduced  
by use of E1, E2b-deleted adenoviral vectors.

Hum Gene Ther, 14: 1715-1726

FOZZARD HA, JENNINGS RB, HABER E, KATZ AM, MORGAN HE (1991)

The heart and cardiovascular system.

Volume II, Kapitel 75, S. 1875

GANOTE CE, WORSTELL J, IANOTTI J, KALTENBACH JP (1977)

Cellular swelling and irreversible myocardial injury. Effects of polyethylene glycol and  
mannitol in perfused rat hearts.

Am J Path, 88: 95-118

GOTTLIEB RA, BURLESON KO, KLONER RA, BABIOR BM, ENGLER RL (1994)

Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes.

Journal Clin Invest, 94: 1621-1628

GRAHAM FL, PREVEC L (1995)

Methods for construction of adenovirus vectors.

Mol Biotechnol, 3: 207-220

## LITERATURVERZEICHNIS

---

GUSTAFSSON AB, GOTTLIEB RA (2003)

Mechanisms of apoptosis in the heart.

J Clin Immunol, 23:447-457

HAIMOVITZ-FRIEDMAN A, KANN C, ENLEITER D (1994)

Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis.

J Exp Med, 180: 525-535

HAJJAR RJ, SCHMIDT U, MATSUI T, GUERRERO JL, LEE KH, GWATHMEY JK, DEC GW, SEMIGRAN MJ, ROSENZWEIG A (1998)

Modulation of ventricular function through gene transfer in vivo.

Proc Natl Acad Sci USA, 95: 5251-5256

HAJJAR RJ, DEL MONTE F, MATSUI T, ROSENZWEIG A (2000)

Prospects for gene therapy for heart failure.

Circ Res, 86(6): 616-621

HALPERN MH (1957)

The dual blood supply of the rat heart.

Am J Anat, 101:1-16

HAUNSTETTER A, IZUMO S (1998)

Apoptosis- basic mechanisms and implications for cardiovascular disease.

Circ Res, 82: 1111-1129

HAWKINS CJ, UREN AG, HÄCKER G, MEDCALF RL, VAUX DL (1996)

Inhibition of Interleukin 1  $\beta$ - converting enzyme-mediated apoptosis of mammalian cells by baculovirus IAP.

Proc Natl Acad Sci USA, 93: 13786-13790

HE TC, ZHOU S, COSTA L, YU J, KINZLER KW, VOGELSTEIN B (1998)

A simplified system for generating recombinant adenoviruses.

Proc Natl Acad Sci USA, 95: 2509-2014

## LITERATURVERZEICHNIS

---

HEBEL R, STROMBERG MW (1976)

Rats, anatomy and history.

Williams und Wilkins, Baltimore, 108-151

HEIMBURGER RF (1946)

Injection into the pericardial sac and ligation of coronary artery of the rat.

Arch Surg, 52: 677

HENGARTNER MO (1997)

Apoptosis and the shape of death.

Dev Genet, 21(4) : 245-248

HIRAMINE C (1997)

Definition and morphological features of apoptosis.

Rinsho Byori, 45: 459-469

IRMLER M, THOME M, HAHNE M, SCHNEIDER P, HOFMAN K, STEINER V,  
BODMER JL, SCHROTER M, BURNS K, MATTMANN C, RIMOLDI D, FRENCH  
LE, TSCHOPP J (1997)

Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP.

Nature, 388 (6638): 190-195

JENNINGS RB, GANOTE CE, KLONER RA, WHALEN DA JR,  
HAMILTON DG (1975)

Explosive swelling of myocardial cells irreversibly injured by transient ischemia.

Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab, 6:405-413

JERJES-SANCHEZ C, SOSA DEL ANGEL E, GARCIA SOSA A, REYES CEREZO  
E, GARZA RUIZ A (2003)

Strategies to improve reperfusion with fibrinolytic therapy in ST-T elevation  
myocardial infarction.

Archivos de Cardiologia de Mexico, 73: 46-58

## LITERATURVERZEICHNIS

---

KAJUSTRA J, CHENG W, REISS K, CLARK WA, SONNEMBLICK EH,  
KARAJEWSKI S, REED JC, OLIVETTI G, ANVERSA P (1996)  
Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of  
infarct size in rats.

Lab Invest, 74: 86-107

KAM PC, FERCH NI (2000)

Review article: apoptosis: mechanisms and clinical implications.

Anaesthesia: 55: 1081-1093

KAMITA SG, MAJIMA K, MAEDA S (1993)

Identification and characterization of the p35 gene of Bombyx mori nuclear polyhedrosis  
virus that prevents virus-induced apoptosis.

J Virol, 67: 455-463

KATAOKA T, SCHROTER M, HAHNE M, SCHNEIDER P, IRMLER M,  
THOME M, FROEHLICH CJ, TSCHOPP J (1998)

FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B,  
chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation.

J Immunol, 161: 3936-3942

KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR (1972)

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

Br J of Cancer, 26: 239-257

KLONER RA, GANOTE CE, WHALEN DA, JENNINGS RB (1974)

Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells. II Fine structure during the  
first few minutes of reflow.

Am J Path, 74 : 399-422

## LITERATURVERZEICHNIS

---

KOSEKI T, INOHARA N, CHEN S, CARRIO R, MERINO J, HOTTIGER MO, NABEL GJ, NUNEZ G (1999)

CIPER, a novel NF kappaB-activating protein containing a caspase recruitment domain with homolgy to herpesvirus-2 protein E10.

J of Biol Chem, 274

KUIDA K, ZHENG TS, NA S, KUAN C, YANG C, KARASUYAMA H, RAKIC P, FLAVELL RA (1996)

Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice.

Nature, 28: 368-372

KUMAR D, JUGDUTT BI (2003)

Apoptosis and antioxidants in the heart.

J Lab Med, 142: 288-297

LAZEBNIK YA, KAUFMANN SH, DESNOYERS S, POIRIER GG, EARNSHAW WC (1994)

Cleavage of poly (ADP-Ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE.

Nature, 371: 346-347

LI F, SRINIVASAN A, WANG Y, ARMSTRONG RC, TOMASELLI KJ, FRITZ LC (1997)

Cell-specific induction of apoptosis by microinjection of cytochrome c.

Bclxl has activity independent of cytochrome c release.

J Biol Chem 1997, 272: 30299-30305

LIN H, PARMACEK MS, MORLE G, BOLLINGER S, LEIDEN JM (1990)

Expression of recombinant gene in myocardium in vivo after direct injection of DNA.

Circulation, 82: 2217-2221

LIU HS, JAN MS, CHOU CK, CHEN PH, KE NJ (1999)

Is green fluorescent protein toxic to the living cells?

Biochem Biophys Res Commun, 260(3): 712-717

## LITERATURVERZEICHNIS

---

LIU Y, CIGOLA E, CHENG W, KAJSTURA J, OLIVETTI G, HINTZE TH,  
ANVERSA P (1995)

Myocyte nuclear mitotic division and programmed cell death characterize the cardiac myopathy induced by rapid ventricular pacing in dogs.

Lab Invest, 6: 771-787

LOS M, WALCZAK H (2002)

Caspases.

Kluwer Academic Press

MACLELLAN WR, SCHNEIDER MD (1997)

Death by design, programmed cell death in cardiovascular biology and disease.

Circ Res, 81: 137-144

MANCINI M, NICHOLSON DW, ROY S, THORNBERRY NA, PETERSON WP,  
CASCIOLA-ROSEN LA, ROSEN A (1998)

The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signalling.

Cellular Biol, 140: 1485-1495

MCLEAN AE, MCLEAN E, JUDAH JD (1965)

Cellular necrosis in the liver induced and modified by drugs.

Int Rev Exp Pathol, 4: 127-157

MIURA M, ZHU H, ROTELLO R, HARTWIEG EA, YUAN J (1993)

Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1-beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the C.elegans cell death gene ced-3.

Cell, 75: 653-660

MIZUGUCHI H (2003)

Basic study for next-generation gene therapy products.

Yakugaku zasshi, 123: 761-771

## LITERATURVERZEICHNIS

---

MULLIGAN RC (1993)

The basic science of gene therapy.

Science, 260: 926-932

MUZIO ET M, CHINNAIYAN AM, KISCKEL FC, O'ROURKE K,  
SHEVCHENKO A, NI J, SCAFFIDI C, BRETZ JD, ZHANG M, GENTZ R,  
MANN M, KRAMMER PH, PETER ME, DIXIT VM (1996)

FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease recruited to the CD95  
(FAS/APO-1) death-inducing signaling complex.

Cell, 85 (6): 817-827

NAGATA S (1993)

Cytokine-mediation of proliferation, differentiation and apoptosis of cells.

Tanpakushitsu Kakusan Koso. Protein, nucleic acid, enzyme, 38, 2208-2218

NAGATA S (1994)

Apoptosis regulated by death factor and its receptor . Fas ligand and Fas.

Philos trans R Soc Lond, Biol Sci, 345: 281-287

NARULA J, PANDEY P, ARBUSTINI E, HAIDER N, NARULA N, KOLODZIE FD,  
BELLO B, SEMIGRAN MJ, BIELSA-MASDEU A, DEC GW, ISRAELIS S,  
BALLESTER M, VIRMANI R, SAXENA S, KHARBANDA S (1999)

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

Proc Natl Acad Sci USA, 96: 8144-8149

NICHOLSON DW, ALI A, THORNBERRY NA, VAILLANCOURT JP, DING CK,  
GALLANT M, GAREAU Y, GRIFFIN PR, LABELLE M, LAZEBNIK YA (1995)

Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian  
apoptosis.

Nature, 376: 37-43

## LITERATURVERZEICHNIS

---

NICHOLSON DW, THORNBERRY NA (1997)

Caspases: killer proteases.

Trends Biochem Sci, 22: 299-306

OBERHAMMER F, FRITSCH G, SCHMIED M, PAVELKA M, PRINTZ D,

PURCHIO T, LASSMANN H, SCHULTE-HERMANN R (1993)

Condensation of the chromatin at the membrane of an apoptotic nucleus is not associated with activation of an endonuclease.

J Cell Sci, 104: 317-326

OLIVETTI G, ABBIR, QUAINI F, KAJSTURA J; CHENG W; NITAHARA JA, QUAINI E, LORETTO C, BELTRAMI CA, KRAJEWSKI S, REED JC, ANVERSA P (1997)

Apoptosis in the failing human heart.

N Engl J Med, 336: 1131-1141

OLTVAI ZN, KORSMEYER SJ (1994)

Checkpoints of dueling dimers foil death wishes.

Cell, 79: 189-192

ORTH K, CHINNAIYAN AM, GARG M, FROEHLICH CJ, DIXIT VM (1996)

The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A.

J Biol Chem, 271: 16443-16446

PERRIN C, ECARNOT-LAUBRIET A, VERGELY C, ROCHETTE L (2003)

Calpain and caspase-3 inhibitors reduce infarct size post-ischemic apoptosis in rat heart without modify contractile recovery.

Cell Mol Biol, 49: 497-505

RAPACCIUOLO A, INDOLFI C, DI LORENZO E, ESPOSITO G, STABILE E, STINGONE AM, AVVEDIMENTO EV, CONDORELLI M, CHIARIELLO M (1994)

Gene therapy for the treatment of restenosis after coronary angioplasty.

Cardiologia, 39: 843-847

## LITERATURVERZEICHNIS

---

RASPER DM, VAILLANCOURT JP, HADANO S, HOUTZAGER VM, SEIDEN I, KEEN SL, TAWAP, XANTHOUDAKIS S, NASIR J, MARTINDALE D, KOOP BF, PETERSON EP, THORNBERRY NA, HUANG J, MACPHERSON PD, BLACK SC, HORNUNG F, LENARDO MJ, HAYDEN MR, ROY S (1998)

Cell death attenuation by Usurpin, a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (FAS, APO-1) receptor complex.

Cell Death Diff, 5: 271-288

RAY CA, BLACK RA, KRONHEIM SR (1992)

Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of interleukin-1-beta converting enzyme.

Cell, 69: 597-604

REED JC, PATERNOSTRO GN (1999)

Postmitochondrial regulation of apoptosis during heart failure

Proc Natl Acad Sci USA, 96: 7614-7616

ROTH MD, CHENG Q, HARUI A, BASAK SK, MITANI K, LOW TA, KIERTSEL SM (2002)

Helper-dependent adenoviral vectors efficiently express transgenes in human dendritic cells but still stimulate antiviral immune response.

J Immunol, 169: 4651-4656

ROTONDA J, NICHOLSON DW, FAZIL KM, GALLANT M, GAREAU Y, LABELLE M, PETERSON EP, RASPER DM, RUEL R, VAILLANCOURT JP, THORNBERRY NA, BECKER JW (1996)

The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis.

Nat Struct Biol, 3: 619-625

ROBERTS L (2001)

The human genome. Controversial from the start.

Science, 291: 1182-1188

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- ROY N, DEVERAUX OL, TAKAHASHI R, SALVESEN GS, REED JC (1997)  
The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases.  
EMBO J, 16:6914-6925
- RUDEL T (1999)  
Caspase inhibitors prevention of caspase.  
Herz, 24:236-241
- RUDIN CM, THOMPSON CB (1997)  
Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death.  
Annu Rev Med, 48: 267-281
- RUSSEL WC (2000)  
Update on adenovirus and its vectors.  
J Gen Virol, 81: 2573-2604
- SAINI KS, WALKER NI (1998)  
Biochemical and molecular mechanisms regulating apoptosis.  
Mol Cell Biochem, 178: 9-25
- SALVESEN GS, DIXIT VM (1997)  
Caspases:intracxellular signaling by proteolysis.  
Cell, 91: 443-446
- SANTANA P, PENA LA, HAIMOVITZ-FRIEDMAN A (1996)  
Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in  
radiation-induced apoptosis.  
Cell, 86: 189-199  
Arch Pathol Lab Med
- SAVILL J (1997)  
Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis.  
Bri Med Bull, 53: 491-508

## LITERATURVERZEICHNIS

---

SAVITZ SI, ROSENBAUM MD (1998)

Apoptosis in neurological disease.

Neurosurgery,42: 555-572

SCHILICHTING CL , LIMAK CM, CESTARI LA JUNIOR , SEKIYAMA JY,

SILVA FM, MILANI H (2004)

Validation of a simple and inexpensive method for the quantification of infarct in the rat brain.

Braz J Med Biol Res, 37: 511-521

SLEE EA, ADRAIN C, MARTIN SJ (1999)

Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis.

Cell Death Differ, 6: 1067-1074

SPADARO J, FISHBEIN MC, HARE C, PFEFFER MA, MAROKO PR (1980)

Characterization of myocardial infarcts in the rat.

Arch Pathol Lab Med, 104: 179

STELLER H (1995)

Mechanisms and genes of cellular suicide.

Science,267: 1445-1455

STERMAN DH, KAISER LR, ALBELDA SM (1998)

Gene therapy for malignant pleural mesothelioma.

Hematol Oncol Clin North Am, 12: 553-568

SUSIN SA, ZAMZAMI N, CASTEDO M, DAUGAS E, WANG HG, GELEY S, FASSY F, REED JC, KROEMER G (1997)

The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in FAS/APO-1/cd95- and Ceramid-induced apoptosis.

J Exp Med,1: 25-37

## LITERATURVERZEICHNIS

---

TAKAHASHI A, ALNEMRI ES, LAZEBNIK YA (1996)

Cleavage of lamin A by Mch2 $\alpha$  but not CPP32: multiple interleukin 1 $\beta$ -converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis.

Proc Natl Acad Sci USA, 93: 8395-8400

TEWARI M, QUAN LT, O'ROURKE K, DESNOYERS S, ZENG G, BEIDLER D, POIRIER G, SALVERSEN G, DIXIT VM (1995)

Yama/ CPP32 beta, a mammalian homologue of CED-3, is a CrmA-inhabitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase.

Cell, 81: 801-809

TEXAS HEART INSTITUTE

[www.texheart surgeons.com](http://www.texheart surgeons.com)

THOME M, SCHNEIDER P, HOFMANN K, FICKENSCHER H, MEINL, NEIPEL F, MATTMANN C, BURNS K, BODMER JL, SCHROTER M, SCAFFIDI C, KRAMMER PH, PETER ME, TSCHOPP J (1997)

Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors.

Nature, 386: 517-521

THORNBERRY NA, BULL HG, CALAYCAY JR, CHAPMAN KT, HOWARD AD, KOSTURA MJ, MILLER DK, MOLINEAUX SM, WEIDNER JR, AUNINS J (1992)

A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes.

Nature, 356: 768-774

THORNBERRY NA, ROSEN A, NOCHOLSON DW (1997)

Control of apoptosis by proteases

Adv Pharmacol, 41: 155-177

## LITERATURVERZEICHNIS

---

THORNBERRY NA, LAZEBNIK Y (1998)

Caspases: Enemies within

Science, 281: 1312-1316

TIERSCHUTZGESETZ VOM 25. MAI 1998

BGBl, 1998: 1105

TRAUTH BC, KLAS C, PETERS AM, MATZKU S, MOLLER P, FALK W,  
DEBATIN KM, KRAMMER PH (1989)

Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis.

Science, 245: 301-305

TORTORELLA D, GEWURZ BE, FURMAN MH, SCHUST DJ, PLOEGH HL (2000)

Viral subversion of the immune system.

Annu Rev Immunol, 18: 861

TSUJIMOTO M, YIP YK, VILCEK J (1985)

Tumor necrosis factor: specific binding and internalization in sensitive and resistant cells.

Proc Natl Acad Sci USA, 82: 7626-7630

UMANSKY, TOMEI LD (1996)

Apoptosis in the heart.

Adv Pharmacol, 41: 383-407

UREN AG, PAKUSCH M, HAWKINS CJ, PULS KL, VAUX DL (1996)

Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor associated factors.

Proc Natl Acad Sci, 93: 4974-4978

VAUX DL, WEISSMAN IL, KIM SK (1992)

Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human Bcl-2

Science, 258: 1955-1957

## LITERATURVERZEICHNIS

---

WALKER C, ROBERTSON L, MYSKOW M, DIXON G, (1994)

Expression of the BCL-2 protein in normal and dysplastic bronchial epithelium and in lung carcinomas.

Br J Cancer, 72: 164-169

WATSON LE, SHETH M, DENYER RF, DOSTAL DE (2004)

Baseline echocardiographic values for adult male rats.

J Am Soc Echocardiogr, 17: 161-167

WYLLIE AH (1997)

Apoptosis: an overview.

Br Med Bull, 53:451-465

WILSON KP, BLACK JA, THOMSON JA, KIM EE, GRIFFITH JP, NAVIA MA, MURCKO MA, CHAMBERS SP, ALDAPE RA, RAYBUCK SA, ET AL (1994)

Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme.

Nature, 370: 270-275

WILSON JM (1996)

Molecular medicine- Adenoviruses as gene-delivery vehicles

N Engl J Med, 334: 1185-1188

YANG Y, SHUAIB A, LI Q (1998)

Quantification of infarct size on focal cerebral ischemia model of rats using a simple and economical method.

J Neurosci Methods, 84: 9-16

YEE D, MC GUIRE SE, BRUNNER N, KOZELSKY TW, ALLRED DC, CHEN SH, WOO SL (1996)

Adenovirus-mediated gene transfer of herpes simplex virus thymidine kinase in an ascites model of human breast cancer.

Hum Gene Ther, 7: 1251- 1257

## LITERATURVERZEICHNIS

---

YUAN J, SHAHAM S, LEDOUX S, ELLIS HM, HORVITZ HR (1993)

The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1-beta-converting enzyme.

Cell, 75: 641-652

ZHANG JC, WOO YJ, CHEN JA, SWAIN JC, SWEENEY HL (1999)

Efficient transmural cardiac gene transfer by intracardial injection in neonatal mice.

J Mol Cell Cardiol, 31: 721-732

ZHOU Q, SNIPAS S, ORTH K, MUZIO M, DIXIT VM, SALVESEN GS (1997)

Target protease specificity of viral serpin CrmA.

J Biol Chem, 272: 7797-7800

ZIMMER HG (1983)

Measurements of left ventricular hemodynamic parameters in closed-chest rats under control and various pathophysiologic conditions.

Basic Res Cardiol, 78: 77-84

ZOU H, LI Y, LIU X, WANG X (1999)

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

J Biol Chem, 274: 11549-11556

### 8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Versuchsplan

Tabelle 2: Körpergewichtsverlauf der p35-Versuchsgruppe und GFP-Kontrollgruppe

Tabelle 3: Entwicklung der linksventrikulären Ejektionsfraktion

Tabelle 4: Erhobene Daten der Tip-Katheter Messung

Tabelle 5: Herzgewicht

Tabelle 6: Infarktgrößenparameter der p35-Versuchsgruppe und der GFP-Kontrollgruppe

### 9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung.1: Bildung der aktiven Caspase
- Abbildung.2: Mechanismus der Apoptose
- Abbildung.3: Durchführung der Intubation  
mit modifiziertem Kinderlaryngoskop
- Abbildung.4: Durchführung der echokardiographischen Messung
- Abbildung.5: Echokardiographische Darstellung des linken Ventrikels,  
parasternaler Längsachsenschnitt
- Abbildung.6: Darstellung der Koronararterien und der Einstichstellen für den  
myokardialen Gentransfer
- Abbildung.7: Ligatur der LAD
- Abbildung.8: Durchführung der Bromphenolblaufärbung
- Abbildung.9: Schnitt eines mit TTC und Bromphenolblau gefärbten Rattenherzens
- Abbildung.10: Körpergewichtsverlauf der beiden Gruppen über den  
Versuchszeitraum
- Abbildung.11: Prozentualer Abfall der linksventrikulären Ejektionsfraktion  
vom Ausgangswert
- Abbildung.12: Entwicklung der linksventrikulären Ejektionsfraktion
- Abbildung.13: Linksventrikulärer systolischer Druck (LVP<sub>sys</sub>) zum  
Messzeitpunkt d 4
- Abbildung.14: Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVP<sub>edp</sub>)  
zum Messzeitpunkt d 4
- Abbildung.15: Maximale linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit  
(dLVP<sub>dt max</sub>)
- Abbildung.16: Prozentualer Anteil des Infarktes an der Area at risk
- Abbildung.17: Absoluter Infarktanteil der p35-Versuchsgruppe an der Area at risk
- Abbildung.18: Absoluter Infarktanteil der GFP-Kontrollgruppe an der Area at risk

**10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

<b>%</b>	<b>Prozent</b>
<b>°C</b>	<b>Grad Celsius</b>
<b>µl</b>	<b>Mikroliter</b>
<b>A.</b>	<b>Arteria</b>
<b>Aa.</b>	<b>Arteriae</b>
<b>Abb.</b>	<b>Abbildung</b>
<b>Ad</b>	<b>Adenovirus</b>
<b>AIF</b>	<b>Apoptosis inducing factor</b>
<b>Apaf</b>	<b>apoptosis protease activating factor</b>
<b>AR</b>	<b>Area at risk</b>
<b>ARC</b>	<b>apoptosis repressor with apoptosis recruitment domain</b>
<b>ca.</b>	<b>circa</b>
<b>CAD</b>	<b>caspase-activated-deoxyribonulease</b>
<b>CAR</b>	<b>cellular adenovirus receptor</b>
<b>C. elegans</b>	<b>Caenorhabditis elegans</b>
<b>CG</b>	<b>control group</b>
<b>cm<sup>3</sup></b>	<b>Kubikzentimeter</b>
<b>Crma</b>	<b>cytokine response mofifier</b>
<b>d</b>	<b>day = Tag</b>
<b>dLVP/dTmin</b>	<b>maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit</b>
<b>dLVP/dTmin</b>	<b>minimale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit</b>
<b>DNA</b>	<b>Desoxyribonukleinsäure</b>
<b>E</b>	<b>early gene</b>
<b>EDV</b>	<b>enddiastolisches Volumen</b>
<b>EF</b>	<b>Ejektionsfraktion</b>
<b>ESV</b>	<b>endsystolisches Volumen</b>
<b>et al.</b>	<b>et altera = und Mitarbeiter</b>
<b>F</b>	<b>french</b>
<b>Fa.</b>	<b>Firma</b>
<b>FADD</b>	<b>Fas- associated death effector domain</b>
<b>FLIP</b>	<b>FLICE-inhibitory protein</b>
<b>g</b>	<b>Gramm</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

<b>G</b>	<b>Group</b>
<b>GA</b>	<b>Gauge</b>
<b>GFP</b>	<b>green fluorescent protein</b>
<b>GmbH</b>	<b>Gesellschaft mit beschränkter Haftung</b>
<b>h</b>	<b>hour = Stunde</b>
<b>IAP</b>	<b>inhibitor of apoptosis proteins</b>
<b>I/AR</b>	<b>Verhältnis von Infarkt zu area at risk</b>
<b>ICAD</b>	<b>inhibitor of caspase-activated.deoxyribonuclease</b>
<b>ICE</b>	<b>interleukin-1-β-converting enzyme</b>
<b>i.d.F.</b>	<b>in der Fassung</b>
<b>i.m.</b>	<b>intramuskulär</b>
<b>i.p.</b>	<b>intraperitoneal</b>
<b>i.v.</b>	<b>intravenös</b>
<b>kDa</b>	<b>Kilodalton</b>
<b>KG</b>	<b>Kontrollgruppe</b>
<b>kg</b>	<b>Kilogramm</b>
<b>KGW</b>	<b>Körpergewicht</b>
<b>L</b>	<b>late gene</b>
<b>LAD</b>	<b>left coronary descending artery</b>
<b>M</b>	<b>Muskulus</b>
<b>MHz</b>	<b>Megahertz</b>
<b>Min.</b>	<b>Minuten</b>
<b>Mm.</b>	<b>Muskuli</b>
<b>mm</b>	<b>Millimeter</b>
<b>mg</b>	<b>Milligramm</b>
<b>ml</b>	<b>Milliliter</b>
<b>MW</b>	<b>Mittelwert</b>
<b>N.</b>	<b>Nervus</b>
<b>o.g.</b>	<b>oben genannt</b>
<b>NaCl</b>	<b>Natriumchlorid</b>
<b>p</b>	<b>Irrtumswahrscheinlichkeit</b>
<b>p35</b>	<b>Protein 35</b>
<b>pfu</b>	<b>plaque forming units</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

<b>s</b>	<b>Sekund(e)</b>
<b>s.c.</b>	<b>subcutan</b>
<b>PBS</b>	<b>phosphate buffered saline</b>
<b>SD</b>	<b>standard deviation = Standardabweichung</b>
<b>sog.</b>	<b>sogenannt</b>
<b>s.Kap.</b>	<b>siehe Kapitel</b>
<b>TierSchG</b>	<b>Tierschutzgesetz</b>
<b>TNF</b>	<b>tumor-necrosis-factor</b>
<b>TNFR1</b>	<b>tumor-necrosis-factor Rezeptor 1</b>
<b>TTC</b>	<b>Tetrazoliumchlorid</b>
<b>u.a.</b>	<b>unter anderem</b>
<b>UV-Strahlung</b>	<b>Ultraviolette Strahlung</b>
<b>v.a.</b>	<b>vor allem</b>
<b>VG</b>	<b>Versuchsgruppe</b>
<b>V.</b>	<b>Vena</b>
<b>vFLIP</b>	<b>viral -FLICE-inhibitory proteins</b>
<b>z.B.</b>	<b>zum Beispiel</b>

### 11 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. vet. J. Hirschberger danke ich für die Übernahme der Arbeit und deren Einreichung an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher, Direktor des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhardt bedanke ich mich für die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung bei der Durchführung des Projektes und die mehrmalige Durchsicht des Manuskriptes.

Herrn PD Dr. med. M. Seyfarth danke ich herzlich für die freundliche Projektbetreuung und Ermutigung bei der Fertigstellung der Arbeit und die Durchsicht des Manuskriptes.

Herrn Dr. med. Karl-Ludwig Laugwitz danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und seine konstruktiven Unterstützung.

Zudem bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. H.-J. Weig für die freundliche Betreuung bei der Durchführung und Fertigstellung der Arbeit.

Mein persönlicher Dank gilt Herrn Dr. med. L. Bott-Flügel, der stets ein offenes Ohr für meine Fragen hatte, mir mit Rat und Tat zur Seite stand und es immer wieder geschafft hat, mich mit seinem Humor zu motivieren.

Ebenfalls ein besonderes Dankeschön gilt Frau G. Wexel für die wunderbare Zusammenarbeit und die intensive fachliche und psychische Unterstützung während meiner gesamten Zeit im Klinikum rechts der Isar.

Mit gleicher Verbundenheit möchte ich Frau Dr. med. vet. F. Leidinger nennen ohne deren Mithilfe diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre und mich herzlich für ihre langjährige Freundschaft bedanken.

Tack så mycket till Sverige!

## **DANKSAGUNG**

---

Ganz herzlich möchte ich mich bei den Tierpflegerinnen und Tierpflegern des Instituts bedanken, insbesondere Frau M. Bathge, für die äußerst verantwortungsvolle Betreuung meiner Tiere.

Meiner Familie möchte ich schließlich ganz besonders herzlich danken, immer für mich da zu sein.

### 12 LEBENS LAUF

Name:	Martina Daniela Knödler
Geburtsdatum:	8. Juli 1975
Geburtsort:	Mutlangen
Nationalität:	deutsch
1981 – 1985	Grundschule in Lorch
1985 – 1992	Progymnasium in Lorch
1992 – 1995	Hans-Baldung Gymnasium in Schwäbisch Gmünd
Juni 1995	Beendigung der Schulzeit mit dem Abitur
1995 – 2001	Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians- Universität, München
März 2001	Approbation als Tierärztin
Juli 2001	Beginn der vorliegenden Dissertation am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität, München
Januar 2001 –	Wissenschaftliche Mitarbeiterin des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität, München
	Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Kardiologie, I.Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität, München
Seit August 2004	Post-Doc Research Fellow an der Tulane University, New Orleans, Health Sciences Center, Department of Medicine, Section of Cardiology