

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I - Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

Kardioprotektive Wirkung der humanen Hämoxxygenase I

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Elena Gottlieb
aus Hildesheim

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Kupatt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Conzen

Prof. Dr. med. Bruno Meiser

Mitbetreuung durch die

promovierten Mitarbeiter: Frau Dr. med. vet. Rabea Hinkel

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2015

Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 ISCHÄMIE UND REPERFUSION	1
1.1.1 Ischämie: Der akute Myokardinfarkt	1
1.1.2 Reperfusion: Der Schaden danach	1
1.1.3 Inflammation	4
1.1.3.1 Zytokine, Wachstumsfaktoren und Mediatoren	4
1.1.3.2 Toll-like-Rezeptoren	5
1.1.3.3 Leukozyteninfiltration	6
1.1.4 Apoptose	9
1.2 HO-1	11
1.2.1 Gentransfer mit rekombinantem AAV	15
1.2.2 Retroinfusion	17
1.3 FRAGESTELLUNG	18
2. MATERIAL UND METHODEN.....	19
2.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	19
2.1.1 Plasmidtransformation	19
2.1.2 RNA-Isolierung.....	22
2.1.3 Reverse Transkription	23
2.1.4 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese	25
2.1.6 Extraktion von Proteinen aus Gewebe und Proteinbestimmung.....	26
2.1.7 SDS-PAGE	26
2.1.8 Western Blot	28
2.2 ZELLKULTURMETHODEN	30
2.2.1 Standardbedingungen und Splitten der Zellkulturen	30
2.2.2 Virusproduktion	30
2.2.3 Hypoxie-Reoxygenationsversuche	32
2.3 TIERMODELL	33
2.3.1 Das Versuchstier: Deutsches Landschwein.....	33
2.3.2 Retroinfusion	35
2.3.3 Versuchsaufbau und –ablauf	37
2.3.4 Euthanasie, Probeentnahme und Infarktfärbung	40
2.3.5 Linksventrikuläre Druckmessung, dLVP/dt und LVEDP	41
2.3.6 Angiographie und Ejektionsfraktion	42
2.3.7 Sonomikrometrie	43
2.3.8 Myeloperoxidase-Assay	45
2.3.9 PECAM-1-Färbung	46
2.3.10 TUNEL-Färbung.....	47
2.4 STATISTIK.....	48
3. ERGEBNISSE	49
3.1 HHO-1- NACHWEIS.....	49

3.1.1 Western Blot	49
3.1.2 QT-PCR	50
3.2 INFARKTGRÖÖE UND GRÖÖE DER AAR	50
3.3 INFLAMMATION.....	53
3.4 APOPTOSE	54
3.5 GLOBALE HERZFUNKTION.....	56
3.5.1 Ejektionsfraktion.....	56
3.5.2 Linksventrikulärer enddiastolischer Druck	57
3.6 REGIONALE HERZFUNKTION	58
3.7 BEOBACHTUNGEN ZUM EINFLUSS DES HHO-1- EXPRESSIONSLEVELS AUF DEN ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADEN	60
3.8 KAPILLARDICHTE	62
3.9 APOPTOSE IN VITRO	64
3.9.1 Myozytenapoptose.....	64
3.9.2 Endothelapoptose	65
3.9.3 Endothelzellen mit Medium von HL-1-Zellen	66
4. DISKUSSION	68
4.1 BEDEUTUNG DER HO-1 FÜR DEN ISCHÄMIE- REPERFUSIONSSCHADEN	68
4.1.1 Kardioprotektive Wirkung der HO-1	68
4.1.2 Anti-inflammatorische Wirkung der HO-1 im Ischämie-Reperfusionsmodell	72
4.1.3 Anti-apoptotische Wirkung der HO-1 im Ischämie-Reperfusionsmodell	75
4.2 METHODENDISKUSSION	78
4.2.1 Transgenes Schweinmodell	78
4.3 KLINISCHE BEDEUTUNG	81
5. ZUSAMMENFASSUNG	84
6. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND AKRONYME	85
7. LITERATURVERZEICHNIS	90
8. DANKSAGUNG	109

1. Einleitung

1.1 Ischämie und Reperfusion

1.1.1 Ischämie: Der akute Myokardinfarkt

Der Myokardinfarkt beschreibt den Zelltod von Herzmuskelzellen aufgrund eines akuten Verschlusses mit folgender Mangel durchblutung (Ischämie) der Herzkranzgefäße.

Der akute Myokardinfarkt stellt eines der häufigsten Krankheitsbilder hospitalisierter Patienten in den Industrieländern dar. In Deutschland erkrankten im Jahr 2011 rund 341 Menschen zwischen 35 und 75 Jahren pro 100.000 Einwohner [230]. Zusätzlich ist der Myokardinfarkt eine der Haupttodesursachen der westlichen Länder. In Deutschland starben im Jahr 2011 55.286 Menschen an einem akuten Herzinfarkt [231].

Da der Umfang der Schädigung des Herzmuskels unter anderem von der Dauer des Verschlusses abhängt, stellt die frühzeitige Revaskularisierung des ischämischen Areals eine der wichtigsten Säulen der Therapie dar, bevor dieses in nekrotisierendes Gewebe übergeht. Therapeutische Optionen wären derzeit Thrombolyse, Bypass-OP und PTCA/Stent. Die Methode der Wahl ist heute die rasche interventionelle Therapie mittels perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA) und zusätzlicher medikamentöser Therapie [1, 2].

1.1.2 Reperfusion: Der Schaden danach

Die zur Eingrenzung der Myokardnekrose notwendige Wiederdurchblutung der Herzkranzgefäße führt zu einer weiteren Gewebeschädigung des gefährdeten Areals [3]. Die letztlich entstandene Infarktgröße setzt sich aus einem Gewebeschaden zusammen, der aus zwei Komponenten besteht. Zum einen gehen Zellen aufgrund des Gefäßverschlusses an sich zu Grunde, zum anderen sterben zuvor vitale Kardiomyozyten nach Einleiten der Reperfusion ab [4]. Der positive Effekt der

Revaskularisierung wird durch den Reperfusionsschaden beeinträchtigt. Die Reduktion der Infarktgröße kann gesteigert werden, sofern der Reperfusionsschaden minimiert wird (siehe Abb. 1). Eine kardioprotektive Intervention zu Beginn der Revaskularisierung zeigt eine deutliche Reduktion des Schadens [5]. Der durch die Ischämie verursachte letale Zellschaden wird durch diese therapeutischen Ansätze nicht behoben. Angriffspunkt dieser kardioprotektiven Maßnahmen ist der irreversible letale Reperfusionsschaden.

Neben diesen irreversiblen Schäden kommt es im Rahmen der Reperfusion aber auch zu reversiblen Funktionsstörungen. Ein bekanntes Phänomen ist das „myocardial stunning“ [6, 7]. Es handelt sich dabei um einen postischämischen reversiblen Schaden, der sich durch eine verminderte Kontraktilität des noch vitalen Gewebes auszeichnet. Dieser mechanische Funktionsverlust bleibt 24 bis 48 Stunden über den Zeitpunkt der Reperfusion hinaus bestehen.

Zum Teil durch den Reperfusionsschaden bedingt ist ebenso das „no-reflow“-Phänomen [8]. Trotz einer Eröffnung der Herzkranzgefäße kann das zuvor ischämische Myokard nicht ausreichend perfundiert werden [9]. Pathophysiologisch spielt vor allem eine Mikrozirkulationsstörung eine entscheidende Rolle, die durch Veränderungen des Endothels mit Adhäsion von Entzündungszellen, Mikrothromben und einem Gewebsödem mit Anschwellen von Endothelzellen und Kardiomyozyten verursacht wird. Außerdem können sowohl Vasospasmen als auch Arrhythmien die Perfusion des Gewebes einschränken [10]. Arrhythmien treten vor allem in der frühen Reperusionsphase auf und sollen im Zusammenhang mit strukturellen Veränderungen des Gewebes wie Fibrose und Ionenverschiebungen in Verbindung stehen [11].

Der letale Reperfusionsschaden beruht auf verschiedenen Mechanismen. Durch die plötzliche Zufuhr von oxygeniertem Blut werden Enzyme wie die Xanthinoxidase zur Produktion von freien Sauerstoffradikalen (O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot) angeregt [5, 12]. Diese reagieren nach Verbrauch von zellulären Radikalfängern mit Zellbestandteilen wie dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) und DNA (Desoxyribonukleinsäure), aber auch mit der Mitochondrienmembran. Dies führt zu einer weiteren Freisetzung von Sauerstoffradikalen und letztlich zu einer starken Zellschädigung. Die Membranintegrität geht verloren, Apoptose und Nekrose finden statt. Es kommt zu einer Peroxidation von Membranlipiden und Denaturierung von Proteinen (unter anderem Enzyme und Ionenkanäle) [13].

Der schon in der Ischämie entstehende Calcium-Overload [14] wird durch die Aktivierung von Iontentransportern wie dem Natrium-Calcium-Austauscher

vorangetrieben. Der Natrium-Calcium-Austauscher sitzt in der Zellmembran und entfernt normalerweise Calcium aus der Zelle. Durch die Ischämie erhöht sich ebenfalls die intrazelluläre Natriumkonzentration, sodass der Austauscher in inverser Funktion aktiviert wird. Es wird vermehrt Natrium aus der Zelle transportiert und im Austausch kommt es zu einer Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration. Es kommt zu einer ATP(Adenosintriphosphat)-abhängigen Aufnahme von Ca^{2+} in das SR [4] und letztlich zu einer weiteren Freisetzung von Calcium aus dem SR ins Zytosol. Hypercalciämie der Zellen kann zu Arrhythmien, Hyperkontrakturen und schließlich zum Zelltod führen [15].

Die sich während der Ischämie entwickelnde intrazelluläre sowie interstitielle Azidose wird mit Zufuhr von Sauerstoff zügig ausgeglichen. Die interstitielle Azidose wird dabei schneller ausgeglichen, wodurch es zu einer vermehrten Aktivität des Natrium-Protonen-Austauschers und des Natrium-Bikarbonat-Transporters kommt [4, 12]. Die vermehrte intrazelluläre Natriumaufnahme führt durch den oben beschriebenen Mechanismus zur Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration und somit zum Zellschaden.

Das ischämische, geschädigte Myokardgewebe verursacht durch die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ (Tumornekrosefaktor- α), IL-6 (Interleukin-6) und IL-1 (Interleukin-1) das Einwandern inflammatorischer Zellen wie Granulozyten, Makrophagen und Monozyten [16]. IL-1 β (Interleukin-1 β) aktiviert die MMP (Matrix-Metalloproteasen) in den Leukozyten und Lymphozyten und führt damit zum Abbau der extrazellulären Matrix inklusive des Kollagens [17]. IL-6 führt zu einem Anstieg des Kollagen 1 und 3 und spielt somit eine wichtige Rolle für das Remodeling. Durch die Aktivierung der Metalloproteasen und die Bildung von Kollagen sollen das geschädigte Gewebe abgeräumt und die Narbenbildung vorangetrieben werden.

Im Rahmen der Revaskularisierung und der damit entstehenden ROS (Reaktive Sauerstoffspezies), der Aktivierung von postischämischem Endothel und der daraus resultierenden Freisetzung pro-inflammatorischer Substanzen kommt es zu einer sich immer weiter entwickelnden Infiltration von hauptsächlich neutrophilen Granulozyten.

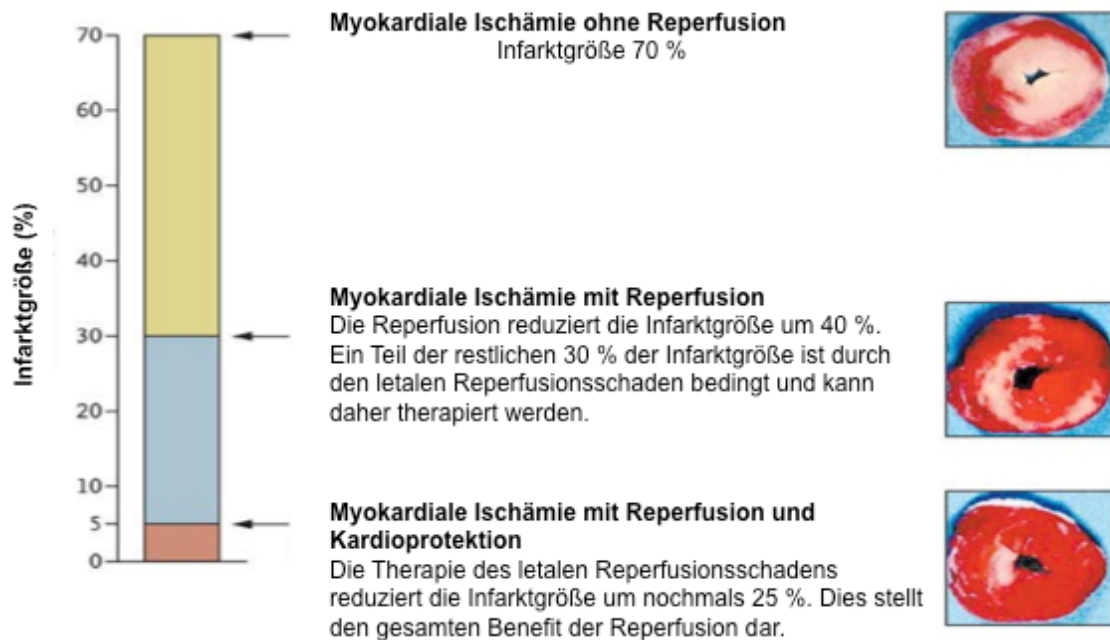


Abb. 1: Schematische Abbildung der Infaktreduktion nach myokardialer Ischämie und Reperfusion. Der letale Reperfusionsschaden überlagert den gesamten Benefit der Reperfusion. Dieser kann erst durch eine kardioprotektive Therapie erreicht werden (modifiziert nach Yellon et al. 2007).

1.1.3 Inflammation

1.1.3.1 Zytokine, Wachstumsfaktoren und Mediatoren

Zytokine sind Glykopeptide oder Proteine, die von verschiedensten Zellen freigesetzt werden und der interzellulären Kommunikation dienen. Sie wirken über Rezeptoren an der Oberfläche von Zielzellen und übertragen derart ein Signal auf die Zelle, woraufhin verschiedene Prozesse intrazellulär in Gang gesetzt werden. Zytokine können ganz unterschiedliche Funktionen haben. Sie dienen zum Beispiel als Wachstumsfaktoren oder Mediatoren in entzündlichen Prozessen. Sie werden in einige Hauptgruppen eingeteilt. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit behandelten Zytokine angesprochen.

Zu den Zytokinen gehören Interleukine, Tumornekrosefaktoren, Wachstumsfaktoren und Interferone. Die Chemokine werden als Sondergruppe zu den Zytokinen gezählt.

Interleukine sind Botenstoffe des Immunsystems, die von unterschiedlichen Zellen ausgeschüttet werden und verschiedene Abwehrzellen zur Reifung und zum Wachstum

anregen beziehungsweise diese Aktivierung inhibieren. IL-1 β und IL-6 wirken pro-inflammatorisch und regen andere Entzündungszellen zur Aktivierung und Freisetzung weiterer Mediatoren an. IL-10 (Interleukin-10) wirkt anti-inflammatorisch und hemmt vor allem die Makrophagenfunktion. Das Interleukin IL-8 (Interleukin-8) ist ein Chemokin und fördert die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und die Expression von Adhäsionsmolekülen.

Der Tumornekrosefaktor TNF- α wird hauptsächlich von Makrophagen freigesetzt und wirkt vor allem gemeinsam mit IL-1 β und IL-6. Neben der Aktivierung des Immunsystems kann er ebenfalls die Apoptose induzieren.

Wachstumsfaktoren wie der Granulozyten-Makrophagen-stimulierende Faktor (GM-CSF) und der Makrophagen-stimulierende Faktor (M-CSF) führen zu einer Stimulation der Hämatopoese und Reifung der Granulozyten und Monozyten, aus welchen sich letztlich die Makrophagen entwickeln.

Interferone sind immunstimulierende Botenstoffe mit vor allem antiviraler Wirkung. Die γ -Interferone werden hauptsächlich von T-Zellen freigesetzt und aktivieren Makrophagen, indem die Phagozytose verbessert wird.

Chemokine sind eine Sonderform der Zytokine und regulieren die Zellmigration und Infiltration. So wie IL-8 gehören auch das monocyte-chemotactic-protein (MCP-1) und das macrophage-inflammatory-protein-1 (MIP-1) zu dieser Gruppe. Sie wirken über verschiedene Rezeptoren und rekrutieren unterschiedliche Zelltypen.

Der Makrophagen-migrationsinhibierenden Faktor MIF ist ein proinflammatorisches Zytokin.

1.1.3.2 Toll-like-Rezeptoren

Toll-like-Rezeptoren (TLR) sind Teil des angeborenen Immunsystems und gehören zu der Gruppe der PRR (pattern recognition receptor). Sie kommen als Transmembranproteine auf verschiedenen Zellen des Immunsystems vor, wie zum Beispiel auf Makrophagen, Monozyten oder auch T-Zellen. Ihre wichtigste Funktion ist die Erkennung von Selbst und Fremd. Dies wird durch die Bindung von Liganden, die spezifisch auf Pathogenen vorhanden sind, erreicht. Diese PAMP (pathogen-

associated molecular patterns) sind Proteine, Kohlenhydrate, Nukleinsäuren oder Lipide von Krankheitserregern. Das Erkennen der PAMP durch die Rezeptoren löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die mit Hilfe von Adaptermolekülen zur Phosphorylierung von Kinasen führt, welche letztlich mit einer Inhibition oder Aktivierung von Transkriptionsfaktoren verschiedener Gene einhergeht. Dadurch können beispielsweise Zytokine zur Erregerbekämpfung freigesetzt werden. Es gibt verschiedene Toll-like-Rezeptoren, die unterschiedliche PAMP erkennen. Dementsprechend werden auch unterschiedliche Signalkaskaden in Gang gesetzt, sodass jeder Krankheitserreger spezifisch bekämpft werden kann.

1.1.3.3 Leukozyteninfiltration

Neutrophile Granulozyten werden durch verschiedene vom ischämischen Myokard und Endothel freigesetzte Substanzen aktiviert, wie zum Beispiel von dem Komplementfragment C5a und Zytokinen wie IL-6, IL-1 β und TNF- α [18]. Die Zytokine werden bereits in der frühen Phase der Ischämie von den Myokardzellen freigesetzt. Später werden sie auch von anderen Zellen, wie den Leukozyten selbst, produziert. Die Bildung dieser Zytokine wird dabei unter anderem von NF- κ B (nuclear factor kappa B) reguliert. Neutrophile können außerdem von ausgeschütteten Produkten aus bereits aktivierten Granulozyten aktiviert werden. Dabei spielen vor allem der pro-inflammatorische Mediator Leukotrien B₄ (LTB₄) als Chemozytokin und der Vasokonstriktor Thromboxan A₂ eine Rolle. Beide entstehen aus dem Vorprodukt Arachidonsäure und fördern die Chemotaxis.

Durch die Reperfusion werden Neutrophile in das vorher ischämische Areal rekrutiert. Die aktivierten Leukozyten treten hauptsächlich an den postkapillären Venolen mit den Endothelzellen in Kontakt [19]. Zunächst gehen die Leukozyten mit den Endothelzellen nur leichte Verbindungen ein und rollen an der Endothelwand. Diese werden durch Adhäsionsmoleküle der Selektin-Familie vermittelt [20]. Das konstitutiv expremierte L-Selektin (CD62L, CD = Cluster of Differentiation) befindet sich auf der Oberfläche von hämatopoetischen Zellen wie zum Beispiel den Leukozyten. P-Selektin (CD62P) wird in den Granula von Thrombozyten und in den Weibel-Palade-Körperchen in Endothelzellen gespeichert und von dort aus auf Stimuli wie Zytokine [21], ROS und Thrombin an die Oberfläche von Thrombozyten und Endothelzellen transportiert [22].

E-Selektin (CD62E) kommt auf der Oberfläche von Endothelzellen vor und wird nach Aktivierung durch Zytokine neu gebildet. Neben unspezifischen Glykolipiden, wie zum Beispiel dem Sialyl-Lewis, ist der spezifische Ligand des P-Selektin der P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) und des E-Selektin der E-Selektin-Ligand-1 (ESL-1) [18, 23]. Diese Liganden befinden sich in der Membran von Leukozyten.

Als nächster Schritt erfolgt die feste Adhäsion der Leukozyten an der Endothelwand. Dieser Teil der Infiltration wird auch „Sticking“ genannt [20]. Vermittelt wird er durch die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (Intercellulare adhesion molecule-1), ICAM-2 (Intercellulare adhesion molecule-2) und VCAM-1 (Vasculare cell adhesion molecule-1) sowie deren Liganden β_2 -Integrine CD11_{a-c}/CD18. β_2 -Integrine sind Glykoproteine, die in der Membran von Leukozyten verankert sind. Die Heterodimere besitzen eine gemeinsame β_2 -Kette (CD18) und jeweils eine α -Kette (CD11a, b oder c). LFA-1 (Leukocyte function associated antigen-1, CD11_a/CD18) wird konstitutiv expremiert, aber kaum in den Granulozyten gespeichert, wohingegen MAC-1 (Macrophage antigen-1, CD11_b/CD18) und p150,95 (CD11_c/CD18) in Granula von neutrophilen Granulozyten und Monozyten gespeichert werden und nach Aktivierung durch Chemokine wie IL-8, Platelet Activating Factor (PAF), MCP-1 und Thromboxan A₂ in die Zellmembran eingebaut werden [24-27]. Das Adhäsionsmolekül der Immunoglobulin (Ig) Superfamilie ICAM-1 spielt bei der Leukozyteninfiltration eine wichtige Rolle. Es wird als Rezeptor für die β -Integrine unter anderem auf den Endothelzellen konstitutiv auf niedrigem Level expremiert. Die Produktion kann durch pro-inflammatorische Mediatoren wie IL-1, TNF- α , ROS und γ -Interferone gesteigert werden [18, 28, 29]. Hierbei scheint NF- κ B als Transkriptionsfaktor eine Rolle zu spielen [30, 31].

Chemokine (IL-8, LTB₄ oder PAF) werden vom Myokard sowie von Leukozyten produziert und spielen in jedem Schritt der Leukozyteninfiltration eine Rolle, vermutlich aber die wichtigste in der Transmigration und Adhäsion der Leukozyten an die Myozyten [28, 32].

Auf molekularer Ebene spielen Adhäsionsmoleküle der Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM)-Familie eine Rolle. Diese Adhäsionsmoleküle befinden sich vor allem an den seitlichen Zellgrenzen der Endothelzellen. Außerdem sind sie Oberflächenmoleküle der hämatopoetischen Zelllinie und demnach auch auf Leukozyten zu finden. Zwischen Leukozyten und Endothelzellen kommt eine homophile Bindung zustande, welche die transendotheliale Transmigration ermöglicht [33-35].

Zytokine wie IL-6 und IL-1 β werden von den ischämischen Myozyten und später von den Leukozyten selbst freigesetzt und führen zu einer vermehrten Expression von dem Adhäsionsmolekül ICAM-1 auf den Myozyten, welche mithilfe der Rezeptoren CD11b/CD18 auf den Neutrophilen in einer Leukozytenadhäsion resultieren [17, 36, 37]. Aktivierte neutrophile Granulozyten setzen zytotoxische Produkte wie ROS und Proteasen frei [20, 38].

Durch Aktivierung des NADPH-Oxidase-Systems entstehen ROS wie Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid und die sehr reaktiven Hydroxyl-Radikale, welche wie oben beschrieben zytotoxisch wirken. Es wird außerdem das Enzym Myeloperoxidase (MPO) aus den azurophilen Granula freigesetzt, welche für die Bildung von Hypochloritionen aus Wasserstoffperoxid und Chloridionen verantwortlich ist. HOCL (hypochlorige Säure) oxidiert Amine zu toxischen Chloraminen [18].

Die Granulozyten setzen über 20 verschiedene proteolytische Enzyme frei, wovon die Elastase eine wichtige Rolle spielt, da sie Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Elastin, Fibronektin, Kollagen III und IV hydrolisiert [18, 24]. Diese von den Leukozyten freigesetzten Stoffe schädigen die Myozyten und Endothelzellen. Es kommt zu einer endothelialen Dysfunktion, die mit einem Verlust an Membranstabilität einhergeht. Dies führt zu einem Fortlaufen der Entzündungsreaktion.

Eine Möglichkeit, den Ischämie-Reperfusionsschaden zu begrenzen, ist die anti-inflammatorische Therapie. Da die Neutrophilen einen entscheidenden Beitrag zu dem myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden leisten, stellen sie einen wichtigen Angriffspunkt für Therapiestrategien dar. Therapien gegen die Neutrophilenaktivierung, die Adhäsion und Migration in das gefährdete Gewebe sowie die Ausschüttung von zytotoxischen Mediatoren wurden bereits untersucht [27]. Dabei wurden sehr häufig monoklonale Antikörper verwendet, die zum Beispiel gegen P-Selektine oder L-Selektine gerichtet sind und somit die Adhäsion verhindern [39], oder gegen Komplementfaktoren wie C5a gerichtet sind und die Aktivierung von Neutrophilen verhindern. Eine Therapie mit Antikörpern geht allerdings mit Nachteilen einher. So haben diese meist eine zu kurze Halbwertszeit ohne einen Langzeiteffekt auf die Protektion. Ein weiteres Problem stellt die Bildung systemischer Antikörper dar, die gegen die therapeutischen Antikörper gerichtet sind. Diese Komplexe führen zu einem Wirkungsverlust der therapeutischen Antikörper [27].

Erfolgversprechend ist die Suche nach anderen geeigneten Therapeutika, die die Inflammation im Ischämie-Reperfusionsschaden begrenzen können, ohne erhebliche Nachteile mit sich zu bringen.

1.1.4 Apoptose

Durch Ischämie und Reperfusion kommt es neben einer erhöhten Entzündungsreaktion auch zum vermehrten Zelltod. Am Herz wird ein großer Teil dieses Schadens durch Nekrose vermittelt. Ein geringer Teil des Zelltods wird nach Ischämie durch Apoptose produziert. Die Apoptose wird aber auch durch Reperfusion des Herzens induziert [40]. Obwohl es die verbreitete Meinung gibt, Apoptose spiele sowohl während der Ischämie als auch während der Reperfusion eine Rolle, vertreten Gottlieb et al. [41] die Ansicht, dass die Apoptose nur während der Reperfusion induziert wird. Im Gegensatz zur Ischämie, bei der die Hypoxie als Hauptursache für die eingeleitete Apoptose im Vordergrund steht, scheint die während der Reperfusion induzierte Apoptose durch die Inflammation hervorgerufen zu werden [42].

Die Nekrose ist die passive Form des Zellunterganges. Sie ist eine Reaktion auf eine von außen einwirkende irreversible Schädigung wie zum Beispiel in Form von Hypoxie oder toxischen Substraten. Sämtliche Stoffwechselprozesse kommen zum Erliegen, da die Energiespeicher verbraucht werden. Es kommt zu einer Schwellung der jeweiligen Zellen, die in einem Zerreißen der Plasmamembran resultiert. Es werden dadurch intrazelluläre Bestandteile freigesetzt und es folgt eine Entzündungsreaktion. Das umliegende Gewebe wird mitbeschädigt. Oft ist ein größeres Gewebeareal betroffen.

Die Apoptose ist der programmierte Zelltod. Durch innere oder äußere Faktoren ausgelöst, wird der Prozess des Zellunterganges aktiv von der Zelle eingeleitet. Unter Energieverbrauch kommt es zu vielen morphologischen Veränderungen wie zum Beispiel zur Zellschrumpfung, der Chromatin-Kondensation und der internukleosomalen DNA-Spaltung. Endonukleasen spalten die zu Beginn noch in größeren Fragmenten vorliegende DNA in kleinere aus circa 180 bp bestehende Stücke. Am Ende fragmentiert die Zelle in sogenannte Apoptosekörperchen. Diese werden schließlich von Makrophagen entfernt. Die Apoptose geht nicht mit einer Entzündungsreaktion einher.

Die Apoptose spielt in der Entwicklung, der Homöostase der Zellzahl, der Immuntoleranz und der Beseitigung defekter oder infizierter Zellen eine Rolle [43]. Fehlfunktionen der Apoptose können zu Erkrankungen führen. Die verminderte Apoptose führt zum Beispiel zu Autoimmunerkrankungen oder zu Tumorentstehung. Eine vermehrte Apoptose führt zu Organversagen und kommt beispielsweise bei neurodegenerativen Erkrankungen vor [43].

Die Apoptose kann durch zwei verschiedene Signalwege eingeleitet werden. Es gibt den rezeptor-abhängigen extrinsischen Signalweg und den mitochondrien-abhängigen intrinsischen Weg. Beide haben eine gemeinsame Endstrecke: die Aktivierung der Effektor-Caspasen. Caspasen (Cystein-dependent aspartate-specific Proteases) sind Proteasen, die kaskadenartig durch proteolytische Schnitte aktiviert werden. Neben Initiator-Caspasen, die die Apoptose einleiten, führen die Effektor-Caspasen 3,6 und 7 durch proteolytische Spaltung wichtiger zellulärer Bestandteile wie Proteine des Zytoskeletts zum Zelltod.

Der extrinsische Signalweg wird durch die Bindung von Liganden an sogenannte Todesrezeptoren eingeleitet. Zu diesen Oberflächenrezeptoren gehören zum Beispiel TNFR-1 (Tumornekrosefaktor Rezeptor-1) und Fas (=CD95=APO-1=apoptosis antigen-1). Durch die Bindung des Liganden an den Rezeptor wird dieser aktiviert und bindet an der zytosolischen Seite Adaptermoleküle, die FADD (Fas-associated death domain protein). Dieser Komplex wird auch DISC (death-inducing signaling complex) genannt. Auch die inaktive Form der Caspase 8 wird von diesem Komplex gebunden und durch autolytische Spaltung kommt es dann zu einer Freisetzung der aktivierten Caspase 8. Diese spaltet weitere Pro-Caspasen und aktiviert somit die Effektor-Caspasen. Außerdem spaltet die Caspase 8 das pro-apoptotische Protein Bid zu tBid (truncated Bid), das in die äußere Mitochondrienmembran transloziert und dort gemeinsam mit weiteren pro-apoptotischen Proteinen wie Bax die Freisetzung von Cytochrom c bewirkt. So wird gleichzeitig der intrinsische Signalweg aktiviert [43].

Der intrinsische Signalweg wird durch Stimuli wie zum Beispiel DNA-Schäden oder oxidativen Stress eingeleitet. Normalerweise besteht ein Gleichgewicht zwischen anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-2 und pro-apoptotischen Proteinen wie Bax, Bak und Bid. Dadurch wird die Integrität der Mitochondrienmembran aufrecht erhalten. Stresssignale führen zu einer verstärkten Expression von Bax und somit dazu, dass pro-apoptotische Proteine überwiegen. Diese bilden Permeabilitäts-Transitions-Poren in der Mitochondrienmembran. Dadurch werden Apoptose-verstärkende Proteine wie Cytochrom c, Smac (second mitochondria-derived activator of caspases) /Diablo (direct

IAP (Inhibitors of apoptosis) binding protein with low pI) und Endonuklease G aus den Mitochondrien ins Zytosol freigesetzt. Cytochrom c formt mit dem Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) einen Komplex, das sogenannte Apoptosom. An diesen bindet die Caspase 9 und wird dadurch aktiviert und setzt die Aktivierungskaskade der Effektor-Caspasen in Gang. Die Endonuklease G fragmentiert die DNA des Zellkerns [43].

Die Apoptose wird strengstens reguliert. Die IAP (Inhibitors of apoptosis) wirken anti-apoptotisch und werden durch Wachstumsfaktoren stimuliert. Sie binden entweder direkt an die Caspasen oder vermitteln deren Ubiquitinierung und damit deren Abbau durch Proteasomen [44].

Als Reaktion auf pro-apoptotische Stimuli werden die IAP in ihrer Funktion wiederum inhibiert. IAP-Inhibitoren sind Smac und Diablo. Sie hemmen entweder direkt die IAP, indem sie deren Bindung an die Caspasen verhindern, oder sie verhindern die Ubiquitinierung der Caspasen und damit deren Abbau. Es gibt auch Inhibitoren, die die Ubiquitinierung von den IAP vermitteln, und somit zu deren Abbau und Funktionsverlust führen [44].

Normalerweise wird das Tumorsuppressorprotein p53 ubiquitiniert und sofort abgebaut, sodass in einer nicht stimulierten Zelle die Konzentration an p53 relativ gering ist. Durch Stimuli wie DNA-Schäden kommt es zur Phosphorylierung von p53, sodass es nicht mehr abgebaut wird, sondern seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausübt. Es induziert die Expression von Genen, die den Zellzyklus arretieren oder die Apoptose einleiten. Zu den pro-apoptotischen Genen zählt vor allem Bax.

1.2 HO-1

Die Hämoxxygenase (HO) oxidiert Häm zu Biliverdin unter Freisetzung von freiem Eisen und Carbonmonoxid (CO) in gleichen Anteilen. Das gebildete Biliverdin wird sofort von dem zytosolischen Enzym Bilirubin-Reduktase zu Bilirubin umgesetzt. Diese enzymatische Reaktion wurde erstmals von Tenhunen et al. 1968 beschrieben [45].

Die HO-1 (Hämoxxygenase-1) befindet sich in vielen verschiedenen Zellen, wie hämatopoetischen Zellen, Knochenmarkszellen und in allen untersuchten Organen

[46]. Sie kommt neben dem Menschen auch in Prokaryoten, Pilzen und Pflanzen vor und reguliert viele intrazelluläre Prozesse [47]. Es gibt drei verschiedene Isoenzyme [48]. Die zwei wichtigsten Isoenzyme haben zwei unterschiedliche Genorte, die aus annäherungsweise 40% identischen Aminosäuresequenzen bestehen [49].

Die 32 kDa schwere HO-1 ist durch verschiedene Pharmaka und Substanzen wie Häm, Schwermetalle, Zytokine, Endotoxine, Hydrogenperoxid [50], NO (Stickstoffmonoxid), Prostaglandine [51], cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) [52], ROS und Umstände wie Stress, Hitze, Schwerkraft, UV-Licht und oxidative Zellschäden induzierbar [53, 54]. Sie ist auch als Hitzeschockprotein-32 (HSP-32) bekannt [55, 56].

Die 34kDa schwere HO-2 wird konstitutiv expremiert und wird nur leicht durch Glukokorticoide und Opiate induziert [47] und kommt vor allem im Hoden und Gehirn vor.

Die HO-Proteine sind durch eine hydrophobe Aminosäuresequenz des Carboxylendes an das endoplasmatische Retikulum verankert [47]. Vor allem nach Induktion scheint die HO-1 auch in anderen Zellkompartimenten vorzukommen. Die HO-1 konnte in der Plasmamembran, den Mitochondrien und dem Zellkern nachgewiesen werden [57, 58] [59].

Die Expression der HO-1 ist hauptsächlich auf Transkriptionslevel reguliert. Proximal und distal der Promotorregion des HO-1 Gens (HMOX-1) befinden sich DNA-Bindungselemente. Verschiedene Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel NF-E2-related factor 2 (Nrf2), Activating Protein-1 (AP-1), AP-2, NF- κ B und STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) binden an diese Elemente und induzieren so die Transkription der HO-1 [60]. Zu den regulatorischen Elementen der Promotorregion des HMOX-1 gehören auch die DNA-Bindungsstellen für die oxidativen Stress responsiven Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel NF- κ B, Nrf2 und AP-2 [61]. Es gibt auch Bindungsstellen für Häm und seine Analoga wie zum Beispiel CoPP (Cobalt Protoporphyrin) (so genannte heme-responsive elements), die durch Bindung ebenfalls die HMOX-1-Transkription steigern [62]. Durch zum Beispiel oxidativen Stress werden die Transkriptionsfaktoren aktiviert. In nicht stimulierten Zellen ist Nrf2 an das Protein Keap 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) gebunden und wird zur Fragmentierung durch Proteasomen ubiquitiniert. Es kann somit nicht in den Zellkern eintreten. Durch Aktivatoren des Nrf2 findet eine Konformationsänderung im Keap 1 statt, sodass Nrf2 nicht mehr an dieses Protein bindet, sondern in den Zellkern transloziert, wo es die Transkription der entsprechenden Zielgene einleitet [63]. Zu den Aktivatoren zählen auch Signalwege der MAP Kinasen (mitogen-activated protein). Zu

dieser Gruppe gehören vor allem drei Hauptgruppen, die ERK (extracellular-regulated kinases), JNK (c-Jun-N-terminalen Kinase) und p38-mitogenaktivierte Proteinkinase. Über verschiedene Signalwege werden Zielgene phosphoryliert und somit in ihrer Aktivität verändert. Bezogen auf die HO-1-Expression werden hier vor allem Transkriptionsfaktoren in ihrer Aktivität beeinflusst [64].

Die Expression der HO-1 kann auch negativ reguliert werden. Hierbei spielt der Transkriptionsrepressor Bach1 eine essentielle Rolle. Er bindet normalerweise an die Stress-responsive Elements (StREs) und verhindert so die Transkription des HMOX-1. Freies Häm oder freie Radikale, die durch oxidativen Stress freigesetzt werden, können an Bach1 binden und seine Konformation verändern. Dadurch wird der Export von Bach1 aus dem Zellkern eingeleitet oder die Fragmentierung von Bach1 durch Proteosomen begünstigt. So können die Transkriptionsfaktoren wie Nrf2 binden und die Transkription kann stattfinden [65].

Die HO-1 kann auch in ihrer Funktion inhibiert werden. Hier spielen Metalloporphyrine wie zum Beispiel Zinkprotoporphyrine (ZnPP) eine wichtige Rolle [62].

Die akute Induktion der HO-1 hat einen positiven Effekt wegen der sofortigen Reduktion des ungewünschten Hämabfalls [66]. Häm wird bei oxidativem Stress freigesetzt und hat zytotoxische Effekte. Häm führt unter anderem zu einer höheren Expressionsrate von dem Chemokin MCP-1 und hat eine pro-inflammatorische Wirkung [67].

Die HO-1 hat eine zytoprotektive Funktion, die sich durch ihre anti-inflammatorische, anti-apoptotische, anti-oxidative und anti-proliferative Wirkung auszeichnet. Zusätzlich fördert sie durch die Produktion von pro-angiogenetischen Faktoren wie VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) die Angiogenese. Dadurch hat sie einen positiven Effekt auf die Wundheilung. Durch diese Wirkungen hat sich ein positiver Effekt der HO-1 im Bereich vieler kardiovaskulärer Erkrankungen gezeigt. So scheint sie durch die Freisetzung des Vasodilatators CO eine blutdrucksenkende Wirkung zu haben. Außerdem beeinflusst sie den Verlauf der Artherosklerose positiv, indem sie die Freisetzung freier ROS reduziert, den Gefäßschaden minimiert, die Endothelzellen schützt, die Inflammation reduziert und das Sterben von Makrophagen verhindert. Auch auf den Ischämie-Reperfusionsschaden hat sie dank ihrer protektiven Eigenschaften eine positive Wirkung und verbessert nach Myokardinfarkt zum Beispiel die Herzfunktion [64]. In anderen wichtigen Krankheitsbildern wie Diabetes mellitus, neurodegenerative Erkrankungen und Sepsis wirkte sich eine HO-1-Überexpression im Tiermodell ebenfalls positiv aus [66, 68].

Neben dem Enzym spielen die lange als toxische Abfallprodukte angesehenen Reaktionsprodukte eine entscheidende Rolle.

CO wirkt wegen seiner starken Affinität zu Hämoglobin als toxisches Gas. Es verhindert durch seine stärkere Affinität zu Hämoglobin den Sauerstofftransport und die Sauerstoffversorgung. Es wird hauptsächlich HO-abhängig freigesetzt. Dabei zeigte sich, dass HO-freigesetztes CO nicht toxisch, sondern im Gegenteil zytoprotektiv wirkt [66].

CO ist über die Aktivierung der Guanylylzyklase als Signalmolekül wirksam [69]. Ein vasorelaxierender Effekt scheint dabei zum einen cGMP abhängig zu sein, wobei dieser Effekt geringer ausgeprägt ist als bei NO. Zum anderen spielen noch andere Einfüsse eine Rolle. CO könnte beispielsweise Vasokonstriktoren reduzieren und damit die Vasodilatation steigern [70]. Ein anderer Effekt ist die Aktivierung von Calciumaktivierenden Kalium-Kanälen [71, 72]. Da CO keine freien Elektronen enthält, ist es im Vergleich zu dem sonst doch sehr ähnlichem NO relativ reaktionsträge. NO reagiert mit ROS zu weiteren noch reaktiveren Produkten [47]. CO wirkt außerdem anti-apoptotisch und anti-inflammatorisch. Diese Wirkungen sollen vor allem durch den MAP Kinase-Signalweg erreicht werden [64].

Auch CO freisetzende Moleküle zeigten eine protektive Wirkung nach Hypoxie und Reoxygenation. Insbesondere das wasserlösliche CORM-3 (Carbon monoxide-releasing molecule-3) hat sich in vorangehenden Studien als effektiver CO-Freisetzer bewährt [73]. Es reduzierte die Infarktgröße. Eine erhöhte Bindung an das Hämoglobin in Form von Carboxyhämoglobin konnte nicht festgestellt werden [73]. Dennoch kann exogen hinzugefügtes CO toxisch wirken, indem es an Hämproteine bindet und somit auch Freisetzung von Superoxiden fördert. Es inhibiert nämlich die NADPH-Oxidase und die Cytochrom c-Oxidase und stört somit die mitochondriale Atmungskette. Die Bildung von ROS wird dadurch verhindert [72]. Es ist wichtig, dass exogen hinzugefügtes CO, auch in Form von CORM, vorsichtig dosiert wird [66].

Biliverdin und Bilirubin sind reduzierende Moleküle und haben daher anti-oxidatives Potential [48]. Bilirubin besitzt ein ausgedehntes System an Doppelbindungen und ein reaktives Wasserstoffatom [74] und kann somit ROS binden. Es verringert so oxidativen Zellschaden in vivo. Biliverdin schützt zusätzlich vor letaler Endotoxämie und hebt damit die Entzündungsreaktion auf. Die hemmende Wirkung auf die NADPH-Oxidase und PKC(Proteinkinase C)-Aktivität erhalten die endotheliale Zellintegrität und verhindern den durch die beiden Enzyme verursachten Gefäßschaden. Die NADPH-Oxidase katalysiert nämlich die Bildung von toxischen Superoxiden [75]. Es hat sich

außerdem gezeigt, dass das Bilirubin einen direkten kardioprotektiven Effekt im Ischämie-Reperusionsmodell hat. So hat sich gezeigt, dass Bilirubin die Wiederherstellung der Herzfunktion verbessert, die Infarktgröße und den Mitochondrienschaden reduziert [76].

Wenn die Bilirubinkonzentration im Blut jedoch zu hoch wird, dann passiert es die Blut-Hirn-Schranke und richtet dort Schaden an, was sich auch Kernikterus nennt [77]. So ist auch hier die protektive Wirkung abhängig von der jeweiligen Konzentration.

Das von der HO freigesetzte Eisen wird sofort in Form von Ferritin gespeichert. Ferritin wird von der HO-1 hochreguliert und bindet das freie Eisen. Freies Eisen wirkt sehr toxisch, da es die ROS-Bildung erhöht. Daher wirkt Ferritin indirekt zytoprotektiv, da es durch die Bindung von freiem Eisen, deren pro-oxidative Wirkung entgegenwirkt. Da Eisen sofort gebunden wird, spielt es im Gegensatz zu CO und Bilirubin eine zu vernachlässigende Rolle [66].

Ein Ausfall der HO-1 begünstigte im Tiermodell schwere Erkrankungen wie Sepsis und chronisch entzündliche Erkrankungen und führte auch intrauterin zur frühen Letalität [65]. Im Menschen äußerte sich ein HO-1-Defizit in Form von hämolytischer Anämie, Koagulopathie, endothelialer Dysfunktion und Arteriosklerose [66]. Die HO-1 hat also durchaus eine wichtige Funktion und ihre Überexpression kann zur Zellprotektion führen.

1.2.1 Gentransfer mit rekombinantem AAV

Der Adeno-assoziierte Virus (AAV) ist ein Dependovirus aus der Familie der Parvoviren. Das Genom besteht aus einer einzelsträngigen DNA, welche 4,7 kB enthält. An den Enden befindet sich eine palindromische Sequenz aus 145 Basen. Diese wird als „inverted terminal repeats“ (ITR) bezeichnet und flankiert zwei offene Leseraster (ORF). Auf dem einen sind die Nicht-Strukturproteine kodiert. Es handelt sich um vier Replikationsproteine (rep), welche für die virale Genomreplikation, Transkription und virale Verpackung zuständig sind. Das andere Gen kodiert drei Strukturproteine für das AAV Kapsid [78, 79]. Das 25 nm große ikosaedrische Kapsid ist vor allem für die Internalisierung, das heißt für die Aufnahme in die Zelle wichtig. Damit erklärt sich auch seine Rolle für den zellulären Tropismus und die

Transduktionseffizienz. Für die Infektion der Wirtszelle und Replikation des Genoms braucht der AAV ein Helfervirus wie zum Beispiel den Adenovirus oder Herpesvirus 6. Ist dieser nicht vorhanden, wird das Genom an einem spezifischen Ort des humanen Chromosoms 19 integriert oder in episomaler Form gespeichert.

Es gibt über zwölf bekannte Serotypen und bereits über 120 bekannte unterschiedliche Kapsidtypen in humanen und nicht humanen Primaten [80]. Der zuerst in Bakterien geklonte Serotyp war der AAV 2. Dieser ist am besten beschrieben und untersucht. Er wurde bereits in den achtziger Jahren in Studien zur Gentherapie benutzt [81, 82].

Bestandteil der Gentherapie ist das Einbringen von Fremd-DNA in die Zelle. Da lose DNA nicht gut in Zellen aufgenommen wird, werden Vektoren genutzt. Es gibt nicht-virale Vektoren, Plasmide, welche hauptsächlich in vitro genutzt werden. Die Vektoren unterscheiden sich vor allem durch Biosicherheit, Herstellung, Effizienz und die zeitliche Dauer der Expression [83]. In vivo haben sich daher hauptsächlich die viralen Vektoren durchgesetzt.

Ein großer Kritikpunkt der viralen Transduktion sind die hohen Sicherheitseinstufungen.

So verstarb unter anderem der 18-jährige Jesse Gelsinger nach einer Transduktion mit einem Adenovirus an Multiorganversagen, als Folge einer schwerwiegenden Immunantwort gegenüber dem verwendeten Adenovirus [84].

Wegen der zum Teil unspezifischen viralen Integration ins Genom spielt auch ein Mutationsrisiko eine Rolle. In diesem Zusammenhang wird vor allem bei Retroviren wie dem Lentivirus die maligne Entartung kritisch betrachtet [84, 85].

In Hinblick hierauf werden AAV immer häufiger in der Gentherapie verwendet. Sie sind in der niedrigsten Sicherheitsstufe eingestuft (S1). Zum einen sind sie nicht humanpathogen, zum anderen weisen sie ohne die gleichzeitige Infektion mit einem Helfervirus ein Replikationsdefizit auf [86]. Die Transduktion mit AAV führt zu einer stabilen Langzeitexpression der jeweiligen Gene [87]. Es können außerdem teilende als auch nicht teilende Zellen transduziert werden. Die Viren sind sehr stabil gegen äußere Einflüssen wie pH-Schwankungen und hohe Temperaturen. Ein anderer sehr entscheidender Punkt ist die geringe Immunogenität im Vergleich zu Adenoviren [88].

Als Nachteil gelten die relativ kleine Expressionskassette, die neutralisierenden Antikörper und die Latenzzeit von circa zwei bis drei Wochen bis zur Genexpression [89, 90].

Rekombinante AAV werden immer häufiger gentherapeutisch eingesetzt. Die häufigste mit AAV behandelte Erkrankung stellt die zystische Fibrose dar [80].

Ein Hybrid-AAV besteht aus einem Capsidprotein der Serotypen 1-9 und dem Genom des gut beschriebenen AAV 2. Der Serotyp 2 transportiert Fremd-DNA gut in andere Zellen. Das Capsidprotein ist für die Zellbindung und Zellmigration der Zielzelle verantwortlich und somit für den Tropismus [81, 93].

Da der Serotyp 9 myotrop ist und insbesondere effizient im Herzen transduziert [90, 94], wurde dieser AAV für unsere Experimente gewählt, für welche wir eine selektive Transduktion der Kardiomyozyten wünschten.

In unseren Experimenten wurde das hHO-1(humane HO-1)-Gen mittels des rekombinanten Hybrid-AAV 2/9 (Genom vom Serotyp 2, Virushülle vom Serotyp 9) transduziert. Im Myokard von Ratten [91] und Schweinen [92] wurde der Transfer der hHO-1 mittels rAAV bereits erfolgreich angewendet.

1.2.2 Retroinfusion

Es gibt verschiedene Möglichkeiten Medikamente, Gene oder Proteine im Myokard anzureichern.

Es wird zwischen systemischer oder regionaler Applikationsform unterschieden. Die systemische Applikation erfolgt über einen peripheren venösen Zugang und stellt die simpelste Form dar. Sie hat den Nachteil, dass systemische Nebenwirkungen auftreten können und höhere Dosen benötigt werden, um die benötigte Konzentration/Expression im Herzen zu erreichen. An regionalen Applikationen gibt es die direkte myokardiale Applikation [95]. Diese kann perkutan oder durch eine offene Operation erfolgen, welche sehr aufwendig wäre. Als weitere Option besteht die perkutane transluminale Applikation in die Herzkranzgefäße.

Einen möglichen effizienten Ansatz stellt die neuentwickelte selektive und druckregulierte Retroinfusion von Koronarvenen dar. Sie wurde entwickelt, um während eines akuten Koronarverschlusses das Myokardgewebe mittels eines perkutanen Herzkatheterverfahrens retrograd über die Koronarvene mit arteriellem Blut zu versorgen. Sie hat sich auch als effektives Applikationsverfahren von Medikamenten erwiesen, denn die selektive Retroinfusion in Venen steigert die lokale Konzentration

von Medikamenten ohne systemische Nebenwirkungen. Versuche zeigten, dass eine retrograde Infusion bei gleichzeitiger Ischämie effektiver war als ohne Ischämie und ebenfalls effektiver war als die arterielle Applikation. Die Passagezeit kann bei Retroinfusion mit Ischämie verlängert werden, was wiederum mit einer höheren lokalen Konzentration einhergeht [96]. Die Retroinfusion wird bereits in Patienten angewendet [97, 98].

Da die selektive Retroinfusion in Herzkranzvene für die regionale Applikation von Medikamenten, Genen und Proteinen sich als so effektiv erwiesen hat [98, 99], haben wir diese auch für unsere Versuche verwendet.

1.3 Fragestellung

Der Ischämie-Reperfusionsschaden hat erhebliche Auswirkungen auf die Herzfunktion nach Myokardinfarkt. In diesem Zusammenhang spielen vor allem Inflammation und Apoptose eine entscheidende Rolle. Da die humane Hämoxxygenase (hHO-1) zytoprotektive Eigenschaften besitzt, haben wir in dieser Studie ihre kardioprotektive Wirkung auf den myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden untersucht. Hierzu nutzten wir ein in unserem Labor bereits etabliertes präklinisches Schweinemodell. Die hHO-1-Überexpression erzielten wir mit transgenen Schweinen sowie mit der Gabe eines AAV. Um eine Aussage über die Wirkung der hHO-1 auf den Ischämie-Reperfusionsschaden zu machen, untersuchten wir Infarktgröße, Herzfunktion und postischämische Inflammation und Apoptose.

2. Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Plasmidtransformation

Die Transformation der Plasmide erfolgte mit Hilfe der Schock-Transformation in transformations-kompetenten *E.coli* (Escherichia coli) TOP10 (Genotyp: F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR nupG recA1 ara D139 Δ (ara-leu)7697 gal E15 galk16 rpsI(Str^R)endA1 λ) (invitrogen, Karlsruhe, Deutschland).

Die zuvor eingefrorenen Bakterien wurden auf Raumtemperatur (RT) aufgetaut. Zu 60 μ l Bakteriensuspension wurden 10 μ l zu transformierende DNA hinzugegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert, 60 Sekunden in einem Wasserbad (GFL, Burgwedel, Deutschland) auf 42°C erhitzt und anschließend für 2 Minuten auf Eis gestellt.

1 ml des SOC(Super optimal broth with catabolite repression)-Medium wurde auf das Gemisch gegeben und für eine Stunde bei 37°C unter Schütteln von 220 rpm (Rotina 420, Hettichzentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) inkubiert.

Im Anschluss wurden die transformierten Bakterien auf eine Kanamycin-Agar-Platte (5 mg/ml, Biochrom, Berlin, Deutschland) ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden nach 24 Stunden mit Glycerin (Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland) bei -80°C gelagert.

Da die Antibiotikaresistenz für Ampicillin im Plasmid enthalten war, wuchsen auf der antibiotikahaltigen Selektionsplatte nur die Bakterienzellen zu Kolonien aus, welche das Plasmid aufgenommen hatten.

Verwendete Plasmidsequenz für hHO-1:

ATGGAGCGTCCGCAACCCGACAGCATGCCC
CAGGATTTGTGTCAGAGGCCCTGAAGGAGGCCACCAAGGAGGTGCACACCCAGGCA
GAGAATGCTGAGTTCATGAGGAACCTTCAGAAGGGCCAGGTGACCCGAGACGGCT
TCAAGCTGGTGATGGCCTCCCTGTACCACATCTATGTGGCCCTGGAGGAGGAGAT
TGAGCGCAACAAGGAGAGCCAGTCTTCGCCCTGTCTACTTCCCAGAAGAGCTG
CACCGCAAGGCTGCCCTGGAGCAGGACCTGGCCTTCTGGTACGGGCCCCGCTGG
CAGGAGGTCATCCCCTACACACCAGCCATGCAGCGCTATGTGAAGCGGCTCCACG
AGGTGGGGCGCACAGAGCCCGAGCTGCTGGTGGCCACGCCTACACCCGCTACC

TGGGTGACCTGTCTGGGGGCCAGGTGCTCAAAAAGATTGCCCAGAAAGCCCTGG
 ACCTGCCCAGCTCTGGCGAGGGCCTGGCCTTCTTCACCTTCCCCAACATTGCCAG
 TGCCACCAAGTTCAAGCAGCTCTACCGCTCCCGCATGAACTCCCTGGAGATGACT
 CCCGCAGTCAGGCAGAGGGTGATAGAAGAGGCCAAGACTGCGTTCTGCTCAAC
 ATCCAGCTCTTTGAGGAGTTGCAGGAGCTGCTGACCCATGACACCAAGGACCAGA
 GCCCCTCACGGGCACCAGGGCTTCGCCAGCGGGCCAGCAACAAAGTGCAAGATT
 CTGCCCCCGTGGAGACTCCCAGAGGGAAGCCCCCACTCAACACCCGCTCCCAGG
 CTCCGCTTCTCCGATGGGTCTTACACTCAGCTTTCTGGTGGCGACAGTTGCTGTA
 GGGCTTTATGCCATGTGA

SOC-Medium:

Bacto-Trypton-Pepton (Becton- Dickinson, Heidelberg, Deutschland)	20 g (2g/l)
Bacto-Hefextrakt (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland)	5 g (0,5g/l)
NaCl (Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland)	0,5 g (10g/l)
Aqua bidestillata	Ad. 950 ml

Zur Herstellung des SOC-Mediums wurden alle der oben genannten Zutaten bis zur Auflösung geschüttelt. Anschließend wurden 10 ml 0,25 M KCl (Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland), 104 mmol MgCl₂ (Sigma, Taufkirchen, Deutschland), 20 mmol Glucose (Merck, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben und der pH mit 5 M NaOH (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf 7,0 eingestellt.

Mit einer sterilen Impföse (Greiner Labortechnik, Kremsmünster, Deutschland) wurde etwas von der Bakterien enthaltenden Flüssigkeit entnommen und in einen Erlenmeyerkolben (Schott Duran AG, Mainz, Deutschland) gegeben, in dem sich neben dem LB(Lysogeny broth)-Medium auch Ampicillin (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) befand. Die Bakterien wurden bei 37°C und unter Schütteln von 225 rpm inkubiert (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland).

LB-Medium:

Bacto-Trypton-Pepton (Becton- Dickinson, Heidelberg, Deutschland)	10 g (10g/l)
---	--------------

Bacto-Hefextrakt (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland)	5 g (5g/l)
NaCl (Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland)	10 g (10g/l)
Aqua bidestillata	1000 ml

Der pH der Mischung wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt.

Nach 24 Stunden wurde das Gemisch in einem Polyethylen-Gefäß 20 Minuten bei 4°C und 6.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen werden. Mit dem Zellpellet wurde die Plasmidpräparation durchgeführt. Hierfür wurde der Maxi-Präp-Kit NucleoBond PC 2000EF (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet.

Nach der Lyse der Bakterien und dem daraus resultierenden Gewinn der Plasmid-DNA, wurde das entstandene Pellet mit endotoxinfreiem H₂O (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) aufgenommen und in Lösung gebracht.

Um die präparierte Plasmidmenge zu bestimmen, wurden 10 µl der DNA mit 990 µl destilliertes (dest.) Wasser (Milli-Q-Anlage Advantage, Millipore, Billerica, MA, USA) verdünnt und in eine Messküvette (Hellma Analytics, Müllheim, Deutschland) gegeben. Die Absorptionsmessung (Photometer: Ultrospec plus Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden) erfolgte bei 260 nm und 280 nm. Da das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm liegt, wird der Quotient zur Bestimmung der Reinheit herangezogen. Dieser sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die Konzentration in µg/µl ergab sich aus der Multiplikation der Absorption bei 260 nm, dem Verdünnungsfaktor und dem konstanten Faktor 50.

Abschließend wurde ein Restriktionsenzymverdau durchgeführt, um die Korrektheit der Transformation zu überprüfen.

1 µl der zu untersuchenden DNA, 1 µl der Enzyme (XbaI (Xanthomonas badrii) (Roche, Mannheim, Deutschland) oder BamHI (Bacillus amyloliquefaciens) (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)), 2 µl Puffer und 16 µl Wasser (alle Bestandteile von invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurden bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden 10 µl des Ansatzes mit 2 µl Loadingpuffer (invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gemischt, auf ein Agarosegel (1% oder 2%, Roth, Karlsruhe, Deutschland) gegeben und eine Gelelektrophorese durchgeführt. Das entstandene Gel

konnte unter einer UV-Lampe (BioRad, München, Deutschland) betrachtet und mit dem nach der Plasmidkarte zu erwartenden Bandenmuster verglichen werden.

2.1.2 RNA-Isolierung

Aus dem Gewebe wurde zunächst RNA durch eine Methode nach Chomcynski [100] gewonnen. Hierzu wurden die jeweiligen Proben mit 1 ml Trizol (Molecular Research Center, Cincinnati, USA) homogenisiert (Ultra-turrax, IKA GmbH, CoKG Staufen, Deutschland). Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform (Merck, Darmstadt, Deutschland) und einer anschließenden 15-minütigen Zentrifugation löste sich die RNA in einer wässrigen Phase von der DNA und anderen Zellbestandteilen. Der Überstand von ca. 0,6 ml wurde in ein neues Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gegeben. Nach Hinzufügen von 0,5 ml Isopropanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und Inkubation von 10 Minuten präzipitierte die RNA. Das nach der 10-minütigen Zentrifugation verbleibende RNA-Pellet wurde anschließend mit 1 ml 75%-igem Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) gewaschen. Das Pellet trocknete in einem Heizblock (Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und wurde im Anschluss mit Wasser in Lösung gebracht.

Die Präparation erzielte eine gute 260 nm/280 nm Ratio von 1,9-2,1. Um das Ergebnis weiterhin zu optimieren wurde ein DNase-Verdau vollzogen.

Es wurden 1 µg RNA mit 1 µl DNase, 1 µl DNase 10x Puffer (beides invitrogen, Carlsbad, USA), sowie 6 µl H₂O vermischt und bei 37°C 30 Minuten inkubiert. Die Verdauungsreaktion stoppte nach Zugabe von 1 µl 25mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) (invitrogen, Carlsbad, USA). Nach einer 10-minütigen Inkubation [101] bei 65°C erfolgte abschließend eine Abzentrifugation.

2.1.3 Reverse Transkription

Mithilfe des Protokolls „Quick Protocol“ von Promega wurde die isolierte RNA mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) in cDNA umgeschrieben.

Es wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß ein Gemisch aus der RNA und den folgenden Bestandteilen (Kit von Promega, Mannheim, Deutschland) angesetzt:

- 4 µl MgCl_2 (25mM)
- 2 µl Reverse Transcription 10x Puffer
- 2 µl dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphat) Mixture (10mM)
- 0,5 µl Recombinant RNAsin Ribonuklease Inhibitor (40u/µl)
- 0,5 µl AMV (Avian Myeloblastosis Virus) Reverse Transcriptase (25u/µl)
- 1 µl Random Primers

Dem Reaktionsmix wurden noch so viel H_2O zugeführt, sodass das Gesamtvolumen 20 µl ausmachte.

Der Reaktionsmix wurde für 10 Minuten bei RT inkubiert, bevor er in einem Heizblock bei 42°C 50 Minuten inkubierte. Abschließend wurde das Gemisch zur Inaktivierung der Reaktion noch für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und für 5 Minuten bei 4°C abgekühlt.

2.1.4 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden durch sich zyklisch wiederholende Phasen definierte, doppelsträngige DNA-Abschnitte vervielfältigt. Zunächst werden die Doppelstränge denaturiert. Es folgt die Primerhybridisierung (Annealing-Phase), während dieser die Primer an die Einzelstränge binden. Abschließend verlängert die DNA-Polymerase bei einer optimalen Temperatur die besetzten Stränge zu Doppelsträngen. Durch Wiederholung der Zyklen vervielfacht sich die DNA-Kopie exponentiell.

Die sogenannte quantitative PCR (qPCR) weist die amplifizierten DNA-Kopien direkt nach jedem Reaktionszyklus nach. Im Vergleich zur konventionellen PCR kann die

anfänglich vorhandene DNA-Menge quantitativ bestimmt werden. Das fluoreszierende Molekül SYBR Green interkaliert unspezifisch DNA-Doppelstränge. Das Fluoreszenzsignal ist dabei proportional zur DNA-Menge.

Die q-PCR wurde mittels des iCyclers und dem iQ SYBR Green Supermix (beides von Bio-Rad, München, Deutschland) durchgeführt. Der verwendete Kit enthielt Pufferlösung, dNTPs, MgCL₂-Stabilisatoren, DNA Polymerase iTaq und SYBR Green I.

Die Reaktionsansätze für den iCycler wurden in eine 96-Well-Platte pipittiert (unterschiedliche Pipetten, Gilson, Middleton, WI und Pipettenspitzen von Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und umfassten je ein Endvolumen von 20 µl, das sich wie folgt zusammensetzte:

- 10 µl Supermix
- 2 µl cDNA (copy-DNA)
- 2 µl Primermix
- 6 µl RNase freies Wasser (Promega, Madison, WI, USA)

Primer

Die verwendeten Primer (eurofins mwg, Ebersberg, Deutschland) amplifizierten ein 301 bp großes Fragment des hHO-1 Gens:

hHMOX1 up: 5'-CAGTCTTCGCCCCTGTCTAC-3'

hHMOX1 down: 5'-TGTTGGGGAAGGTGAAGAAG-3'

GAPDH up: 5'-TCTTGGGGTACACTGAGGAC-3'

GAPDH down: 5'-ACCAGGAAATGAGCTTGACA-3'

Das Protokoll für den iCycler sah folgendermaßen aus [101]:

Programmteil	Zyklusanzahl		Temperatur	Dauer
Präinkubation	1		94°C	2 min
Amplifikation	35	Denaturation	94°C	20 s
		Annealing	60°C	30 s
		Extension	72°C	45 s

Elongation	1		72°C	5 min
-------------------	---	--	------	--------------

Für die Auswertung wurde der Zyklus mit dem maximalen Anstieg des Fluoreszenzsignals mit C_t („Cycle Threshold“ für den Schwellenzyklus) definiert.

Um die Ergebnisse unabhängig von der unterschiedlichen Menge an anfänglicher DNA zu machen, erfolgte die Quantifizierung im Verhältnis zum Haushaltsgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) anhand folgender Formel:

$$\Delta C_t = 2^{(C_t(\text{Gen}) - C_t(\text{GAPDH}))}$$

2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe und Konformation erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese. So konnte das PCR-Produkt ebenfalls mittels Gelelektrophorese anhand seiner spezifischen Größe identifiziert werden.

Es wurden 2%-ige Gele verwendet. Die Agarose wurde in 1x TAE (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)-Acetat-EDTA)-Puffer (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gekocht (1 g Agarose (Roth, Karlsruhe, Deutschland), in 50 ml in 1x TAE-Puffer) und anschließend auf 60°C gebracht und mit 2 µl (Stocklösung 1%-ige) Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe, Deutschland) versetzt. Nach Erstarren des Gels in der Gelkammer, wurde dieses mit 1x TAE-Puffer (Roth, Karlsruhe, Deutschland) beschichtet und die Proben mit 6x DNA-Ladepuffer (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) in die Taschen pipettiert. Dann wurde eine Spannung von 100 V für 45 Minuten angelegt und im Anschluss die Charakterisierung der Banden im UV-Licht identifiziert. Zur Identifizierung der Größe läuft eine DNA-Leiter mit unterschiedlichen Fragmenten bekannter Größe parallel zu dem PCR-Produkt. Die Menge des PCR-Produktes kann anhand der Stärke der Banden visualisiert werden.

2.1.6 Extraktion von Proteinen aus Gewebe und Proteinbestimmung

Es wurden jeweils myokardiales Gewebe aus dem Kontrollareal und der AAR (Area at risk) der Kontrollgruppe, der Transgenen-Gruppe, der AAV-Gruppe sowie der Inhibitorgruppe verwendet. Die Extraktion der Proteine aus dem Gewebe erfolgte mit Hilfe des Lysepuffers (Complete Lysis-M, EDTA-free, Roche, Penzberg, Deutschland). 500 µl wurden jeweils zum abgeschlagenen Gewebe hinzugefügt und zerkleinert. Nach 10-minütiger Zentrifugation wurde die Proteinmenge durch die BCA(Bicinchoninsäure)-Methode [102] bestimmt. Sie beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} . Die BCA komplexiert mit den Cu^{+} -Ionen, was sich durch eine purpurne Farbe auszeichnet. Das Absorptionsmaximum besteht bei 562 nm.

Um Rückschlüsse auf die Proteinkonzentration in den Proben zu ziehen, wurde eine Standardkurve mit BSA (Bovines Serumalbumin) angefertigt. Das BCA-Gemisch bestand aus einer 50:1-Mischung von Reagent A: Reagent B (BCA Protein Assay Kit, Pierce Chemical, Rockfort, USA). Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bestimmt. Mithilfe der Standardkurve und dem Absorptionswert bei 1 µg/µl konnte die Proteinmenge in µg/µl berechnet werden.

2.1.7 SDS-PAGE

10% Acrylamid-Gel

30% Acrylamid	33,25 ml
2M Tris pH 8,9 filtriert (Roth, Karlsruhe, Deutschland)	16,6ml
0,5M EDTA filtriert	0,663ml
Aqua dest.	49,49ml
Endvolumen	100ml

Trenngel

Acrylamid 10%	10 ml
APS 10% (Ammoniumpersulfat) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)	75 µl
TEMED (Tetramethylethyldiamin) (Serva, Heidelberg, Deutschland)	25 µl

Sammelgel (4%)

30% Acrylamid	14,3 ml
2M Tris pH 6,8	16,6 ml
ddH ₂ O	69,1 ml
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>100 ml</i>

Sammelgel (4%)

Sammelgel (4%)	4 ml
10%APS (Ammoniumpersulfat) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)	25 µl
TMED (Tetramethylethyldiamin) (Serva, Heidelberg, Deutschland)	15 µl

10x Laufpuffer

30,2 g Tris Base, 144 g Glycin (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 10 g SDS (Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurden in 1000 ml ddH₂O gelöst.

SDS(Natriumdodecylsulfat)-Loading Puffer

2 ml Tris, 0,4 g SDS, 0,02 g Bromphenolblau (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) und 2 ml Glycerol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurden in 10 ml ddH₂O gelöst. Kurz vor Nutzung des Puffers wurde 0,2 M Dithiothreitol (Serva, Heidelberg, Deutschland) hinzugefügt.

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) denaturiert die Proteine, das heißt sie hebt ihre Faltungsstruktur auf und verhindert unterschiedliche Ladungen, sodass die Trennung nur durch die Molmasse bestimmt wird.

Zwischen die beiden Glasplatten wurde das Trenngel gefüllt. Als oberste Schicht wurde Isopropanol hinzugegeben, damit das Gel eben blieb. Die Polymerisation des Acrylamids wurde durch Zugabe von APS und TEMED eingeleitet. Sobald das Gel fest war, wurde das Isopropanol entfernt und mit H₂O gewaschen und abgetupft.

Nach Abschluss der Polymerisation wurde ein Kamm eingeführt, das Sammelgel eingegossen und mit Wasser bedeckt.

Die Kämmen wurden entfernt, die Zwischenräume mit Laufpuffer gereinigt und die Proben aufgeladen. Hierfür wurden 40 µg Protein der Proben mit 5 µl SDS-Loading-Puffer versetzt und 5 Minuten bei 96°C denaturiert. In das Elektrophorese-Reservoir wurde für 5 Minuten bei 30mA Laufpuffer gegeben und anschließend für 1,5 Stunden bei 60mA angelegt.

2.1.8 Western Blot

Nach Beendigung der SDS-PAGE wurden das Gel sowie die Polyvinylidendifluorid(PVDF)–Membran (Bio-Rad, München, Deutschland) je 15 Minuten im Transferpuffer inkubiert.

Transferpuffer

2,98 g Glycin, 5,8 g Tris Base, 0,8 g SDS und 200 ml Methanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurden in einem Liter ddH₂O gelöst.

Für dieses Blotting wurde die PVDF-Membran auf das Elektrophorese-Gel aufgebracht und zwischen zwei Schichten von jeweils drei Lagen 3MM Whatmann (Herolab, Wiesloch, Deutschland) und einem befeuchteten Schwamm gelegt. Der senkrecht zur Membran gerichtete Proteintransfer lief angelegt bei 100 V für 1 Stunde ab.

Die Membran wurde anschließend bei RT für 30 Minuten in 5% Magermilch (Roth, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert. Die Magermilch diente als Blocking Puffer. Nach mehrfachem Waschen mit PBS (Phosphate-buffered-saline) (Sigma, München, Deutschland) wurde die Membran bei 4°C über Nacht mit dem ersten Antikörper (hHO-1, invitrogen, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Nach 3x 5 Minuten Waschen mit TBS (Tri-buffered-saline) (10x TBS: 80 g NaCl, 24,3 g Tris, Ad 1000 ml H₂O, pH 7,6) + 0,05% Tween-20 (Roth, Karlsruhe, Deutschland) konnte der mit HRP (Horseradish Peroxidase) markierte sekundäre Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) hinzugegeben werden. Nach zwei Stunden wurde wiederholt mit TBS-Tween-20 gewaschen.

Als Letztes wurde die "Enhanced Chemical Luminescence Lösung" (ECL-Lösung) für 3 Minuten hinzugegeben. Das Luminol dieser Chemolumineszenz-Lösung wird unter Abgabe von blauem Licht in einer HRP-katalysierten Reaktion oxidiert. Auf diese Weise kann ein in einer Photokassette eingelegter, blaulicht-sensitiver Film an entsprechenden Stellen belichtet und die mit Antikörpern markierte Bandenstruktur sichtbar gemacht werden. Nach digitaler Auswertung des belichteten Filmmaterials erfolgte so der semiquantitative Nachweis der hHO-1-Aktivität im untersuchten Herzareal.

ECL-Lösung

Hierfür wurde Das Kit „Pierce ECL Western blotting substrate“ (Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Es enthält eine Peroxidase-Lösung sowie eine Luminol Enhancer-Lösung.

2.2 Zellkulturmethoden

2.2.1 Standardbedingungen und Splitten der Zellkulturen

Die Zellen wurden in ihrem Medium (HMEC (Human mammary epithelial cells) und HEK-293 (Human embryonic kidney 293): DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma, Steinheim, Deutschland) mit 10% FBS (Fetal Bovine Serum) (Sigma, Taufkirchen, Deutschland); HL-1: Claycomb Medium (SafcBiosciences, Lenexa, Kansas, USA)) bei einer Temperatur von 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% im Brutschrank (Binder, Tuttlingen, Deutschland) kultiviert (Zellkulturschalen von TPP, Trasadingen, Schweiz). Zum Splitten der Zellen wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und folgend 2 Minuten bei 37°C mit Trypsin (Biochrom, Berlin, Deutschland) inkubiert. Das Zelllösen konnte mit dem jeweiligen Serum gestoppt werden. Die aufgenommenen Zellen wurden 5 Minuten bei 1200 rpm sedimentiert und auf ein neues Kulturmedium gegeben.

2.2.2 Virusproduktion

Einen Tag vor der Transfektion wurden die HEK-293-Zellen wie oben beschrieben gesplittet, sodass die Konfluenz am nächsten Tag 70-80% betrug. Zwei Stunden vor der Transfektion wurden das Medium gewechselt und die Zellen bei 37°C inkubiert. Statt DMEM mit 10% FBS wurden je 18 ml DMEM ohne FBS + 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland) vorsichtig auf die Platte (150 mm Durchmesser) gegeben.

Für das Transfektionsgemisch wurden 40 ml serumfreies Medium in einem 50 ml-Falcon (Zentrifugenröhrchen, TPP, Trasadingen, Schweiz) vorgelegt. Hinzugefügt wurden nacheinander die benötigten Plasmide [103]:

- 1,3 mg Delta F6

- 650 µg Capsidplasmid AAV 2/9

- 650 µg Transgenplasmid (hHO-1)

Die DNA-Medium-Mischung wurde gevortext (IKA-Werk, Staufen, Deutschland) und anschließend auf vier Falcons mit je 10 ml verteilt. Zu jedem Falcon wurden 15 ml serumfreies Medium gegeben und erneut gevortext. Abschließend wurden 1,3 ml PEI (Polyethylenimine) (1 µg/µl; Polyethylenimine linear, Polyscience, Warrington, USA) zu jedem Falcon hinzugegeben, gevortext und 15 Minuten bei RT inkubiert.

2,1 ml des Gemisches wurden schließlich tropfenweise auf jede Platte gegeben.

Nach vier Stunden erfolgte die Zugabe von 5 ml DMEM mit 50% FBS (1% P/S) und nach 24 Stunden der Mediumwechsel mit DMEM 10% FBS (1% P/S).

Drei Tage nach der Transfektion fand die Zellernte statt. Dafür wurde das Medium entnommen, die Zellen wurden abgeschabt und suspensiert. Die Suspension wurde für 5 Minuten bei 4°C und 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in PBS aufgenommen und nochmals für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden nun bei -80°C bis zur Aufreinigung eingefroren.

Die Zellen wurden 10 Minuten bei 37°C aufgetaut und das Pellet mit 27 ml Tris/MgCl₂-Puffer (50 mM Tris, 1 mM MgCl₂, pH 7,4) suspendiert.

Die Zellmembran der Zellen wurde mit Ultraschall zerstört. Dafür wurden die Falcons in einem Ultraschallgerät 3x 30 Sekunden mit einem Output von 5/ 30% bearbeitet.

Um die außerhalb des Viruskapsids freie DNA und RNA abzubauen, wurden 3 µl Benzonase (25 U/ml, Sigma, München, Deutschland) hinzugefügt. Bei einer Inkubation von 20 Minuten bei 37°C wurde alle 5 Minuten invertiert. Um die Zellbestandteile löslicher zu machen, wurde anschließend 1,25 ml 10%-ige Desoxycholsäure (Sigma, Steinheim, Deutschland) hinzugefügt und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 4000 rpm wurde der Überstand in ein steriles Falcon überführt und das Volumen bestimmt.

Nun wurden 0,454 g/ml CsCl₂ (Caesiumchlorid) (Roth, Karlsruhe, Deutschland) abgewogen und gemischt. Für die Dichtegradient-Aufreinigung [103] wurden zwei unterschiedliche CsCl₂-Dichten benötigt: $\rho = 1,61$ und $\rho = 1,41$. In die Beckmann SW 28-Tubes (Beckmann, München, Deutschland) wurden zunächst 9 ml der leichteren Lösung gefüllt und anschließend 9 ml der schweren Lösung untergeschichtet. 20 ml der Virenlösung wurden letztlich vorsichtig auf den Gradienten gegossen und 18-24 Stunden bei 25.000 rpm und 15°C zentrifugiert (Optima L-80 XP Ultracentrifuge, Beckmann, München, Deutschland).

Am nächsten Tag wurde milliliterweise der Gradient abgenommen und in 36 1,5 ml-Eppis gegeben. Die Aliquots wurden dann im geeichten Refraktometer gemessen. Der Refraktationsindex wurde bestimmt. Die Fraktion zwischen 1,362 und 1,373 wurden aufgehoben und in 70 Ti-Röhrchen Quick Seak Beckmann 342413 (Beckmann, München, Deutschland) bei 60.000 rpm und 15°C 20-24 Stunden zentrifugiert.

Am nächsten Tag wurde der Gradient in 0,5 ml Aliquots abgenommen und der Refraktationsindex bestimmt. Die Aliquots mit Werten zwischen 1,362 und 1,373 wurden erneut in die Beckmann-Röhrchen gegeben und mit CsCL₂ 1,41 h/ml-Lösung aufgefüllt.

Am darauf folgenden Tag wurde der Gradient wieder entnommen und der Refraktationsindex der 0,5ml-Aliquots gemessen. Diejenigen mit Werten zwischen 1,364 und 1,371 wurden mit 20 ml PBS in einem Anicon Ultra-15 Ultracel 10K Filter (Millipore, Billerica, USA) 10-15 Minuten bei 3.000 rpm zentrifugiert, bis das Konzentrat auf 1 ml durchzentrifugiert war. Ein weiteres Mal wurde mit PBS gewaschen und zentrifugiert bis auf 1 ml. Nun konnte der Überstand in Cryotubes (Roth, Karlsruhe, Deutschland) überführt werden. Der Filter wurde drei Mal mit je 200 µl PBS abgewaschen, um möglichst alle Viren in Lösung zu bekommen. Die Viren wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Der Virusnachweis erfolgte mittels quantitativer PCR. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe von vier Verdünnungen (1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng und 0,001 ng Plasmid) angefertigt. Anhand der Standardkurve konnten schließlich die Kopieanzahl und somit der Titer bestimmt werden.

2.2.3 Hypoxie-Reoxygenationsversuche

Die Versuche erfolgten in verschiedenen Versuchsreihen. In einer Reihe wurden nur transfizierte und untransfizierte HMEC ausplattiert. Eine weitere Reihe bestand aus ausplattierten HMEC, denen kurz vor der Hypoxie das Medium von transfizierten und untransfizierten HL-1-Zellen hinzugefügt wurde. Schließlich wurden die Überlebensversuche auch mit transfizierten und untransfizierten HL-1-Zellen durchgeführt. Zu einigen mit hHO-1-transfizierten Wells wurde der spezifische Inhibitor ZnPP (10 mM, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) hinzugegeben.

Die Transfektion der Zellen wurde mit dem Transfektionsmittel Lipofectamine (invitrogen, Carlsbad, USA) durchgeführt. Pro Ansatz wurde zunächst das DNA enthaltende Plasmid in dem serumfreien Medium Opti-MEM (invitrogen, Carlsbad, USA) gelöst. In einem anderen Eppendorfbehälter wurde das Transfektionsmittel Lipofectamine ebenfalls mit Opti-MEM gemischt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde das gelöste Plasmid zu dem Lipofectamine-Gemisch gegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei RT wurden die Zellen schließlich transfiziert. Bei dieser Transfektion kann von einer Überexpression im Zeitraum von 24-72 Stunden ausgegangen werden. Danach konnten die Hypoxie-Reoxygenationsversuche eingeleitet werden.

Die Hypoxiezeit betrug bei den HMEC 18 Stunden und bei den HL-1-Zellen 12 Stunden. In dieser Zeit wurden die Zellen in einer Hypoxiekammer platziert. Diese Kammer ist luftdicht verschlossen. Von der Kammer führt ein Schlauch zu einem NO-Anschluss. Zu Beginn des Versuchs wurde 15 Minuten lang NO in die Kammer eingeleitet, um den Sauerstoffgehalt zu reduzieren. Danach wurde der Zufluss mit einem Klipp verschlossen. Während der Hypoxiezeit kann von einem Sauerstoffgehalt von 1-2% ausgegangen werden.

Die Reoxygenationszeit betrug bei den HMEC vier Stunden und bei den HL-1-Zellen zwei Stunden. Die Zellen wurden hierfür im Brutschrank bei 37°C und 5%-igem CO₂ gelagert. Der Nachweis der apoptotischen HMEC erfolgte mittels TUNEL-Färbung (siehe 2.3.10). Das Zellüberleben der HL-1-Zellen wurde mittels Trypanblau (Sigma, München, Deutschland) ermittelt.

2.3 Tiermodell

2.3.1 Das Versuchstier: Deutsches Landschwein

Die Haltung der Tiere und Durchführung der Versuche erfolgte im Walter-Brendel-Institut für experimentelle Forschung in Großhadern gemäß den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes von 2009. Die vorliegende Studie wurde von der Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ 55.2-1-54-2531-26-09) und mit Zustimmung der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt. Die Studie

umfasst drei Gruppen mit n=5 und eine Gruppe (Inhibitor) mit n=4. Das mittlere Körpergewicht (KG) betrug 25 kg +/- 1,3 kg.

Transgene Schweine

Die transgenen hHO-1-überexpmierenden Schweine wurden in Neustadt im Friedrich-Löffler-Institut unter der Leitung von Prof. H. Niemann generiert [104].

Fibroblasten wurden aus transgenen Schweinen der deutschen Landrasse entnommen und in DMEM kultiviert. Der zu transfizierende Vektor enthielt eine hHO-1-Sequenz unter Kontrolle des SV40-Promoters sowie eine Antibiotikaresistenz für Neomycin. Die Transfektion erfolgte mittels Elektroporation mit 450 V/350 µF. Die erfolgreich transfizierten Zellen überlebten die 14-tägige Selektion mit G418 (800µg/ml). Eine für den Vektor im PCR-Nachweis positive Zelle wurde für den somatischen Zellkerntransfer (SCNT) benutzt.

Oozyten wurden aus den Ovarien von Schweinen der deutschen Landrasse entfernt und unter anderem mit Chorionic Gonadotropin erhalten. Aus den Oozyten wurde der Zellkern mit den Chromosomen in der Metaphase entfernt.

Ein hHO-1-transfizierter Fibroblast wurde zum Zelltransfer benutzt. Dieser wurde durch ein calciumfreies SOR2 Medium (Sorbitol, Mg-Acetat, 0,1% BSA) und einen Singel-Elektrischen Impuls von 1,1 kV/cm für 100 Sekunden eingeleitet. Nach der Verschmelzung der Membranen der beiden Zellen wurde der neu entstandene Embryo durch ein elektrisches Feld, SOR2 Aktivierungsmedium (Sorbitol, Calciumacetat, Magnesiumacetat und 0,1% BSA) und folgender Inkubation mit 6-Dimethylaminopurin (Sigma, München, Deutschland) in NCSU-23 Medium (North Carolina State University Medium-23) aktiviert.

Sieben bis neun Monate alte deutsche Landschweine mit einem Gewicht von 100-130 kg dienten als Empfängertiere.

Um den Embryo zu erhalten wurden vor und nach der Implantationsoperation ecG (Equine chorionic gonadotropin, Intergonan, Intervet, Unterschleißheim, Deutschland), hCG (humanes Choriongonadotropin) (Intervet, Unterschleißheim, Deutschland) und Altrenogest (Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) gegeben. Sechs Stunden nach der Ovulation wurden die Embryos mittels medianer Laparotomie in Allgemeinnarkose in die Eileiter der Empfängertiere eingesetzt. Nach 115 Tagen wurden die transgenen Nachkommen geboren. Der hHO-1-Nachweis erfolgte mittels PCR und Western Blot.

Die Nachkommen der ersten Generation wurden auf das unterschiedliche Expressionslevel untersucht. Die Tiere mit der höchsten Genexpression wurden untereinander gepaart und lieferten die Nachkommen der zweiten Generation, die ein hohes klonales Expressionsniveau erreichten und die Grundlage für unsere als transgen bezeichneten Tiere darstellten [104].

Inhibitor- Gruppe

Vier ubiquitär hHO-1-überexpremierende Schweine wurden mit dem spezifischen Inhibitor der Hämoxygenase ZnPP behandelt.

100 mg ZnPP wurden 5 Minuten vor Beginn der Reperfusion über den Retroinfusionskatheter retrograd in die anteriore interventrikuläre Vene (AIV) gegeben.

AAV-Gruppe

Die mit einem hHO-1-enthaltenden AAV behandelte Gruppe umfasste fünf deutsche Landschweine.

Der Virus (1×10^{13} Viruspartikel) wurde drei Wochen vor Beginn der Ischämie und Reperfusion 15 Minuten über Retroinfusion gegeben.

Nach der Intervention wurden die Katheterschleusen entfernt, die Muskel- und Hautschichten genäht (Ethicon, Norderstedt, Deutschland), die Narkose ausgeleitet und die Tiere in den Stall zurückgebracht.

2.3.2 Retroinfusion

In unseren Versuchen wurde eine modifizierte Methode der kontinuierlichen druckregulierten Retroinfusion angewendet [96], um den AAV 2/9 hHO-1 und den spezifischen Inhibitor ZnPP zu applizieren.

Das Prinzip der SSR (Selective pressure-regulated retroinfusion) ist auf die erstmals von Meerbaum beschriebene synchronisierte Retroperfusion (SRP) [105] zurückzuführen.

Es handelt sich dabei um eine Möglichkeit, das ischämische Areal retrograd, also von der venösen Seite aus, mit Blut oder Therapeutika zu versorgen. Die Infusion erfolgt während der Diastole über einen Katheter. So kann das venöse Gefäßsystem aufgrund der geringeren Druckspitzen geschont werden.

Im Gegensatz zur SRP erfolgt bei der SSR die Applikation selektiver, indem der Katheter direkt in die das ischämische Areal drainierenden Koronarvene platziert wird und das Blut direkt über den Katheter abgesaugt werden kann.

Das System der SSR [106] besteht aus einem Hochdruckreservoir, einer Rollerpumpe, einer Excenterklappe, dem 4-Lumen-Retroinfusionskatheter und einer Absaugeinrichtung. Die Steuerung des Systems erfolgt über eine EKG-Triggerung.

Die vier Lumina des Katheters dienen der Infusion, der Druckmessung im venösen System, der Inflation des an der Spitze befindlichen Ballons und der Absaugung.

Die Anwendung der Retroinfusion wurde folgendermaßen durchgeführt.

Zunächst wurde ein 7F Cournand-Katheter (Cordis®, Miami, USA) über die rechte Vena jugularis eingeführt und über den rechten Vorhof in die Vena cordis magna platziert. Es konnte anschließend ein 0,018l Führungsdraht (Road Runner Extra Support, Cook, Bjæverskov, Dänemark) in die AIV vorgeschoben werden. Nachdem der Katheter entfernt wurde, diente der Draht dem 7F Reperfusionskatheter (SSR-Katheter) (MPK 002, PTC Pro-Med Technology Consult GmbH, Mödling, Österreich) als Führungsschiene.

Vor Beginn der Retroinfusion wurde der systolische Venenverschlussdruck bei erhaltener anteriorer Perfusion bestimmt. Für einige Sekunden wurden der Ballon inflatiert und der systolische Venendruck gemessen. Der optimale Retroinfusionsdruck liegt 20 mmHg über den systolischen Plateau [96]. Für unsere Interventionen wurde dementsprechend meist ein Druck von 60 mmHg gewählt.

Nun konnte mit dem 8F Judkins Führungskatheter (Cordis®, Miami, USA) die linke Koronararterie aufgesucht und eine Koronarangiographie (Gerät von Digimed, Taufkkrichen, Deutschland, Kontrastmittel Imeron 350, Nycomed, Konstanz, Deutschland) durchgeführt werden. Mit Hilfe eines weiteren Führungsdrahtes wurde dann der 3 mm x 10 mm große PTCA-Ballon (Arthoas 3.0mm x10.0mm, amg, Raesfeld-Erle, Deutschland) in der LAD (left anterior descending artery) der linken Koronararterie kurz distal des Abgangs des ersten Diagonalastes platziert. So wurde während der Applikation in die AIV die das entsprechende Areal mit Blut versorgende LAD mit dem PTCA Ballon okkludiert. Der PTCA-Ballon wurde während der

Intervention mit einem In-/Deflator (Road Runner Extra Support, Cook, Bjaeverskov, Dänemark) inflatiert.

Als Trägersubstanz des Retroinfusats diente 0,9%-iges NaCl (B.Braun, Melsungen, Deutschland). NaCl wurde in dem Hochdruckresevoir aufbewahrt. Diesem unter Druck (1000 mmHg) stehenden Reservoir war ein Schließmechanismus in Form des Excenter-Ventils nachgeschaltet. Die Einstellungen bezüglich der Öffnungszeiten des Ventils sahen folgendermaßen aus: Die Öffnung fand 150-200 ms vor Ende der Systole statt und dauerte 80% der Diastole. Die retrograde Infusion erfolgte während jedem vierten Herzschlag (1 : 4 = Pumpaktion : Herzschlag). Überstieg der venöse Druck, welcher kontinuierlich durch den integrierten Druckabnehmer des Retroinfusionskatheters gemessen wurde, den zuvor definierten Retroinfusionsdruck, so schloss sich die Klappe und die Absaugung startete. Es begann anschließend ein neuer Zyklus.

Die Applikation des AAV 2/9 hHO-1 und des ZnPP erfolgte in den oben genannten Konzentrationen und Zeiten über eine Perfusorspritze, die dem Retroinfusat geschützt durch ein Rückschlagventil zugeführt wurde.

2.3.3 Versuchsaufbau und –ablauf

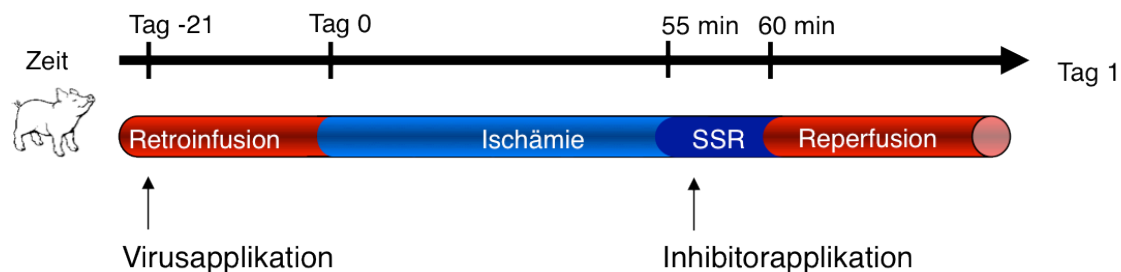


Abb. 2: Versuchsaufbau und –ablauf des Ischämie-Reperfusionsmodells

Tag -21	Virusapplikation
Tag 0	-LVEDP -EF -Koronarverschluss -Inhibitorapplikation -24-stündige Reperfusion
Tag 1	-LVEDP -EF -Sonomikrometrie -Infarktfärbung -Gewebeentnahme (für PCR, MPO-Messung, PECAM-1-Färbung und TUNEL-Färbung)

Abb. 3: Übersicht über den Versuchsaufbau der einzelnen Tage

Eine Übersicht über den Versuchsaufbau und -ablauf zeigen Abb. 2 und 3.

Die Narkose wurde jeweils mit 20 mg/kg KG Ketamin (Inresa, Freiburg), 10 mg/kg KG Azaperon (Stressnil, Jansson-Cilag, Neuss, Deutschland) und 0,5 mg Atropin (Atropinsulfat 0,5 mg/ml, B.Braun, Melsungen, Deutschland) eingeleitet.

Über einen Zugang (Venenkanüle 22 GA, BD, Heidelberg, Deutschland) der Ohrvene wurden anschließend 5 mg Midazolam (Midazolam ratiopharm 15 mg/3ml, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) und 7,5 mg Piritramid (Dipidolor, Jansson-Cilag, Neuss, Deutschland) verabreicht.

Die endotracheale Intubation erfolgte mit Hilfe eines Laryngoskops (Lo-Contour, Magill, Mallinckrodt Medical, Athlone, Irland) und eines 6,5 mm dicken Tubus' (Portex-Tubus, Seidel medipool, Gautin-Buchendorf, Deutschland).

Anschließend wurde das Tier sicher auf dem Operationstisch gelagert und mit 60%-igem Sauerstoff beatmet (Dräger Servo Ventilator 900, Drägerwerk, Lübeck, Deutschland). Zur Aufrechterhaltung der Narkose diente die intravenöse (i.v.) Applikation von 10 mg/kg KG/h Propofol (Disoprivan 2%, AstraZeneca, Wedel, Deutschland) über einen Perfusor (Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland). Ebenfalls i.v. wurde während der gesamten Intervention 0,9%-ige NaCl-Lösung mit

Zusatz von 150 mg Amiodaron (Cordarex, Sanofi-Aventis, Frankfurt, Deutschland) und 1000 mg Magnesium (Magnesium Verla, Verla-Pharm Arzneimittel, Tutzing, Deutschland) und 6%-ige HES(Hydroxyethylstärke)-Lösung (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) verabreicht. Zur Überwachung wurden das Elektrokardiogramm (EKG) (Theracard 361 D, Siemens, München, Deutschland) über drei Klebeelektroden abgeleitet und das Pulsoxymeter (BOC Healthcare, Manchester, UK) angeschlossen.

Zum Einführen der Katheter wurden Schleusen (Avanti+ Introducer, Cordis Europe AA, Roden, Niederlande) in die Halsgefäße gelegt. Hierzu erfolgte nach vorangegangener Rasur ein Hautschnitt (Skalpell, Feather Safety Razor Co, Osaka, Japan) über dem Musculus Sternocleidomastoideus. Nach Gabe von 10.000 I.E. (Internationalen Einheiten) Heparin (Heparin-Natrium 25000 IE/5 ml, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) wurde die Vena jugularis mit einer 11 F Schleuse und die Arteria carotis interna mit einer 8 F Schleuse kanüliert.

Der arterielle Zugang über die Schleuse wurde mit dem auf Herzhöhe des Tieres angebrachten Druckabnehmer (Stetham Transducer, Hellige-Monitor, Freiburg, Deutschland) konnektiert. Folgend diente die Aufzeichnung des arteriellen Drucks als hämodynamische Überwachung. Über die arterielle Schleuse wurden ebenso der Conductance-Katheter (Millar pressure tip catheter SPC 560, Millar instruments, Texas, USA) für die linksventrikuläre Druckabnahme, der Pigtail-Katheter (infinityTM, Cordis, Roden, Niederlande) für die Angiographie-Darstellung, sowie der Judkinskatheter (Cordis, Miami, USA) zur Koronargefäßdarstellung und der Ballonkatheter zum Verschluss des Gefäßes eingeführt.

Nachdem die Messungen der globalen Herzfunktion (siehe Punkt 2.3.5 und 2.3.6) am Tag 0 erfolgreich abgeschlossen wurden, konnte der einstündige Koronarverschluss eingeleitet werden [107].

Dazu wurde unter Durchleuchtung zunächst der Judkinskatheter mit Hilfe eines Führungsdrahtes (Road Runner Extra Support, Cook, Bjæverskov, Dänemark) in das linke Herzkranzgefäß gebracht. Zur Darstellung der Gefäße wurde Kontrastmittel appliziert. Sofern der Katheter richtig in den Abgang der LAD positioniert wurde, wurde der Führungsdraht entfernt und ein dünnerer Draht in das Gefäß vorgeschoben. Dieser zweite Draht diente dem Ballonkatheter als Führungsschiene. Der 3 mm x 10 mm große PTCA-Ballon wurde in der LAD kurz distal des Abganges des ersten Diagonalastes platziert. Mithilfe eines Inflators (Cook, Bjæverskov, Dänemark) wurde der Ballon unter Druck gesetzt und verschloss derart das Gefäß. Zur Kontrolle der

Position wurde immer wieder das Koronargefäß unter Durchleuchtung dargestellt. Während der einstündigen Ischämie wurden regelmäßig EKG und Blutdruck kontrolliert.

Nach einer Stunde Ischämie wurden das Gefäß wieder eröffnet, der Ballonkatheter entfernt, die Durchgängigkeit des Gefäßes unter Durchleuchtung kontrolliert und die 24-stündige Reperfusion eingeleitet. Bevor die Schleusen entfernt und Muskel- und Hautschnitt zugenäht (Supolene, Resorba, Nürnberg, Deutschland) wurden, bekam das Tier Cefuroxim i.v. (Hikma, Gräfelfing, Deutschland).

Am Tag 1 wurde wie am Vortag erneut die globale Herzfunktion bestimmt. Nach Eröffnung des Brustkorbs mittels Längssternotomie von der Fossa jugularis bis kurz unterhalb des Processus Xiphoideus, Perikardinzision und Platzierung des Thoraxspreizers (Medicon, Tuttlingen, Deutschland), wurde am offenen Herzen die regionale Herzfunktion mit Hilfe der Sonomikrometrie (siehe Kapitel 2.3.7) bestimmt. Anschließend erfolgte die Euthanasie.

2.3.4 Euthanasie, Probeentnahme und Infarktfärbung

Die Euthanasie erfolgte mit 5 ml Propofol i.v. und 20 ml gesättigter Kaliumchloridlösung (Dr. F. Köhler Chemie, Bensheim, Deutschland) intraapikal.

Nach dem Herzstillstand wurde zunächst die LAD auf Höhe der Okklusion vom Vortag ligiert. Zur Darstellung des Versorgungsgebietes der RCX (Ramus circumflexus) der linken Koronararterie als Kontrollareal wurde anschließend 10 ml des Farbstoffes Methylenblau (Sigma, München, Deutschland) manuell über den linken Ventrikel in die Koronarien injiziert. Das Kontrollgebiet färbte sich nun blau, die AAR blieb ungefärbt.

Um das Herz zu entnehmen, wurden nun alle zu- und abführenden Gefäße durchtrennt. Ex vivo wurde schließlich die LAD distal der Okklusion kanüliert und 10 ml des Vitalfarbstoff Tetrazoliumrot (Sigma, Aldrich, Steinheim, Deutschland) injiziert. Das vitale Gewebe der AAR konnte vom avitalen Infarktgewebe durch eine intensive Rotfärbung unterschieden werden.

Im Anschluss an die Infarktfärbung wurde das Herz senkrecht seiner Längsachse in fünf 2 cm dicke Schichten (= *Slices*) geschnitten. Diese Scheiben wurden digital

fotografiert (Canon, Krefeld). Die Bilder dienten der späteren digitalen Flächenmessung (Sigma Scan pro 3, Statcon, Witzenhausen, Deutschland).

Für spätere histologische und molekularbiologische Auswertungen wurden aus den Scheiben transmurale Gewebeproben von den zu beurteilen Arealen (Infarkt, AAR und Kontrolle) entnommen. Diese wurden mit Azeton (Merck, Darmstadt, Deutschland) vorgefroren und bei -80°C bis zur Vermessung aufbewahrt.

2.3.5 Linksventrikuläre Druckmessung, $d\text{LVP}/dt$ und LVEDP

Die Messung des linksventrikulären Drucks (LVP) fand unter Ruhebedingungen vor und nach Ischämie statt. Der mit einem Druckabnehmer versehene Pigtailkatheter wurde vor Beginn der Messung mit einer 2-Punkt- Kalibrierung auf 0 und 100 mmHg geeicht.

Unter Durchleuchtung wurden der Katheter schließlich im Bereich der Herzspitze in der linken Herzhöhle positioniert, der LVP gemessen und aufgezeichnet.

Bildet man die erste Ableitung des LVP nach der Zeit, so erhält man den Kontraktilitätsindex $d\text{LVP}/t$. Er ist ein Maß für die Druckanstiegs- und Druckabstiegsgeschwindigkeit im linken Ventrikel. Er spiegelt die Kontraktilität und Relaxation des Herzmuskels während der Herzaktion wider.

Der linksventrikuläre Druck am Ende der Diastole (LVEDP=Linksventrikulärer enddiastolischer Druck) gibt Auskunft über die Auswurfleistung des linken Ventrikels. Ist diese verringert, so steigt der LVEDP im Anschluss an die Systole an. Als Messzeitpunkt für das Ende der Diastole wurde der kleinste Wert des $d\text{LVP}/dt$ gewählt. Dies entspricht dem stärksten Abfall der linksventrikulären Druckkurve und spiegelt das Ende der Diastole wider.

Sowohl der $d\text{LVP}/dt$ als auch der LVEDP stellen anerkannte Referenzwerte für die globale Herzfunktion dar.

2.3.6 Angiographie und Ejektionsfraktion

Die Röntgendarstellung mit dem C-Bogen diente der Kontrolle der Platzierung der Pacer-Elektrode am rechten Herzhohr, des Conductance-Katheters an der Herzspitze und des Judkin- und Ballonkatheters in der LAD. Die Gefäßdarstellung erfolgte als Koronarangiographie mit Hilfe von nicht-ionischem jodhaltigem Kontrastmittel. Die richtige Position des Judkinkatheters in der LAD wurde mit Gabe eines Kontrastmittelboluses überprüft. Nach Inflation des Ballons stellte die Kontrastmittelapplikation sicher, dass kein Blutfluss distal der Okklusion mehr gewährleistet wurde.

Die genannten Darstellungen erfolgten in 90°-LAO-Projektion. Die Angiographien des linken Ventrikels zur Ermittlung der Ejektionsfraktion (EF) wurden in 60°-LAO-Projektion aufgenommen.

Zunächst wurde der Pigtail-Katheter über die arterielle Schleuse und die Aorta ascendens in den linken Ventrikel gebracht. Mit der Applikation von Kontrastmittel über den Katheter konnte der Umfang des linken Ventrikels dargestellt werden.

Am Computer wurde schließlich planimetrisch mithilfe des Image J die Fläche des linken Ventrikels im enddiastolischen (EDF) sowie endsystolischen (ESF) Zustand bestimmt und folgend die EF berechnet werden:

$$EF = (EDF - ESF) / EDF \times 100$$

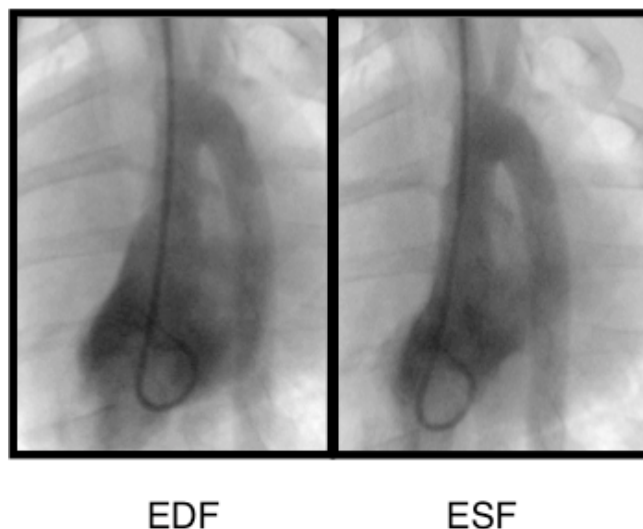


Abb. 4: Angiographien des linken Ventrikels. Dargestellt sind der enddiastolische (EDF) und endsystolische (ESF) Zustand des Ventrikels. Aus diesen Flächen lässt sich die EF bestimmen

2.3.7 Sonomikrometrie

Die subendokardiale Segmentverkürzung (SES) spiegelt die regionale Herzfunktion als indirekten Marker für die Herzischämie wider.

Mit einem Skapell (Feather, Osaka, Japan) erfolgte die Stichinzision ins Epikard. Die Ultraschallkristalle (Sonometrics, London, Ontario, Kanada) konnten nun mit Hilfe einer Kunststoffführungshülle stumpf ins Myokard vorgeschoben werden. Der Abstand zweier zusammengehöriger Kristalle betrug 1-2 cm. Ihre Ausrichtung wurde senkrecht zur Längsachse gewählt, da dies der maximalen Kontraktionsrichtung entspricht. Es wurden zwei Kristallpaare im Versorgungsgebiet der LAD und ein weiteres im Zielareal der RCX platziert. Für die AAR betrug der Abstand von der LAD-Okklusionsstelle 1 cm, wohingegen für das Infarktgebiet 3 cm gewählt wurden.

Die Segmentverkürzung des Herzmuskels wurde bei unterschiedlichen Herzfrequenzen gemessen. Dazu wurde der Sinusknoten mithilfe eines Schrittmachers stimuliert. Die Platzierung der Pacer-Elektrode des Schrittmachers (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) erfolgte über den venösen Zugang. Unter Durchleuchtung und Kontrolle des abgeleitenden EKGs wurde die Pacer-Elektrode nahe des Sinusknoten am rechten Herzhohr platziert.

Die in das Myokard eingebrachten Ultraschallkristalle dienten der Abstandsmessung während des Kontraktionszykluses. Der Abstand zwischen den Kristallen veränderte sich fortlaufend, wobei der Abstand zwischen ihnen zum Ende der Diastole am größten und zum Zeitpunkt der Systole am kleinsten war.

Die aus Piezokristallen bestehenden Ultraschallkristalle wurden mit einem Ultraschallentfernungsmessgerät (Sonomicrometer, Triton Technology Inc, San Diego, USA) verbunden, welches wiederum Verbindung zu dem Computer (Rechner Pentium II 200MHz, HSE, March-Hugstetten) hatte, um dort den Abstand fortlaufend graphisch auf dem Monitor festzuhalten.

Die Ultraschalllaufzeit-Messmethode wurde modifiziert nach Bugge-Aspersheim angewendet [108]. Das Prinzip besteht darin, dass ein Ultraschallkristall ein Signal von 5 MHz entsendet, welches nach einer bestimmten Laufzeit von dem zweiten Ultraschallkristall empfangen und an das Ultraschallentfernungsmessgerät weitergeleitet wird.

Die Berechnung des Abstandes beider Kristalle erfolgte folgendermaßen [109]:

$$s = v \cdot t$$

***s** = Abstand der beiden Kristalle, **v** = Schallausbreitungsgeschwindigkeit im Myokardgewebe **t** = Laufzeit des Ultraschallsignals*

Für die Schallausbreitungsgeschwindigkeit wurde annäherungsweise angenommen, dass sie derjenigen des Blutes entspricht (1500-1560 m/s) [108]. Für jeden Zeitpunkt konnte mithilfe der Ultraschalllaufzeit ein Kristallabstand berechnet werden.

Die eigentliche subendokardiale Segmentverkürzung wird ausgedrückt in Prozent der enddiastolischen Länge und wurde mit der Formel nach Harada et al. [110] berechnet:

$$SES[\%] = (EDL - ESL) \cdot 100 / EDL$$

***SES** = Segmentverkürzung, **EDL** = enddiastolische Länge, **ESL** = endsystolische Länge*

Neben den Kristallabständen wurden parallel linksventrikulärer Druck und EKG aufgezeichnet.

Nach Kenntnissen von Heimisch et al. [109] wurden die Zeitpunkte, zu denen enddiastolische und endsystolische Länge gemessen wurden, in Abhängigkeit von der ersten Ableitung des linksventrikulären Drucks nach der Zeit (dLVP/dt) bestimmt.

Die Enddiastole wurde definiert als Beginn der Systole und weist somit einen linksventrikulären Druckanstieg von gerade null auf. Die Endsystole ist definitionsgemäß der Zeitpunkt der maximalen linksventrikulären Druckabfallgeschwindigkeit.

Die Längen dieser Messzeitpunkte wurden in obige Formel eingesetzt und somit die subendokardiale Segmentverkürzung in den jeweiligen Arealen berechnet.

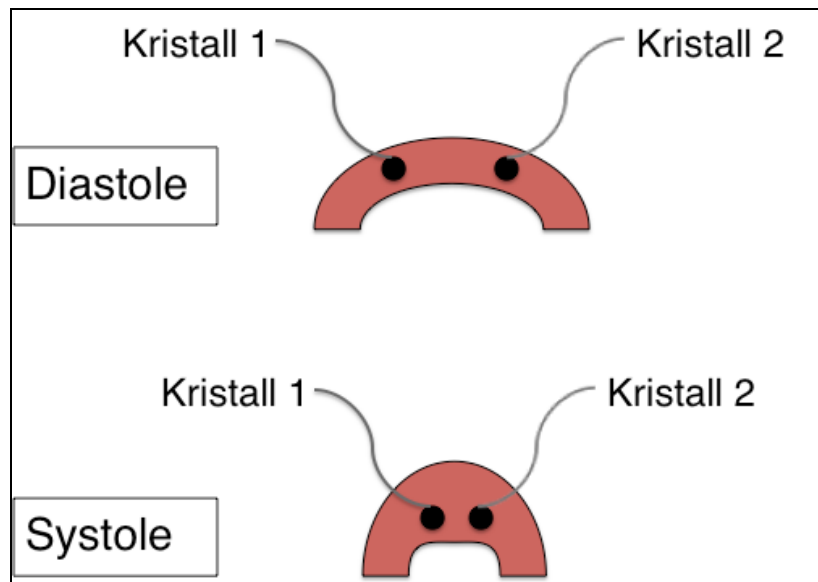


Abb. 5: Schematische Darstellung der Ultraschallkristalle im Myokard

2.3.8 Myeloperoxidase-Assay

Die Myeloperoxidaseaktivität ist ein indirekter Nachweis neutrophiler Granulozyten [101], da die Myeloperoxidase ein Enzym ist, welches spezifisch überwiegend in der Granula dieser Zellen vorkommt.

Zunächst wurde eine Standardkurve erstellt, indem Leukozyten aus dem Blut von Schweinen isoliert wurden.

Hierzu wurden 10 ml Blut in einem EDTA-Röhrchen (Monovette, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) entnommen und 15 Minuten bei 250 rpm zentrifugiert (Laborfuge, Eppendorf 1200rpm).

Die oberste Erythrozytenphase wurde mit EDTA und Calcium-freien PBS gemischt und zu der Perkolllösung (NaCl+ Perkoll (Hamersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)+ H₂O) hinzugegeben. Das gesamte Gemisch wurde im Anschluss für 20 Minuten bei RT bei 400 rpm (Jouan 1500 rpm) zentrifugiert. Um die Erythrozyten zu lysieren wurde es schließlich noch 30 Sekunden mit eiskaltem Wasser vermischt und nach Zugabe vom PIPES (Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)-Puffer (Pipes (Merck, Darmstadt, Deutschland)+ NaCl+KCl, pH 7,4) bei 1000 rpm erneut zentrifugiert (Jouan 2500 rpm).

Das entstehende Zellpellet wurde mit dem PAG-Puffer (Pipes-Puffer+ Albumin+Glucose) gewaschen und zentrifugiert. Die Zellpellets wurden mit Pipes-Puffer aufgenommen und ein Teil zum Zählen der Leukozyten (COULTER® AC T diff™, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) verwendet. Der Rest wurde für die MPO-Messung eingesetzt.

Dazu wurden die Pellets mit Phosphatpuffer und darin gelöstem HTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid, Sigma Ultra, Steinheim, Deutschland) aufgenommen und für 10 Sekunden geultrafaxt. Um die Zellen zum Platzen zu bringen wurden sie anschließend drei Mal auf -80°C eingefroren und wieder auf RT aufgetaut. Schließlich wurden eine 30-minütige Zentrifugation bei 40000 rpm (UZ, Beckmann, TI 60-Rotor, 20000 rpm) durchgeführt und der Überstand in die MPO-Messung eingesetzt. Für die Standardkurve wurden eine unverdünnte, eine 1:2, 1:4 und 1:8 verdünnte Lösung verwendet.

Für die MPO-Messung im Gewebe wurden circa 150 mg abgewogen und wie oben beschrieben für die Messung vorbereitet. Das Gewebe musste hierfür sehr gut mit dem Ultraturraxgerät (Ultra-Turrax, IKA-Werk GmbH & CoKG, Staufen, Deutschland) zerkleinert werden. 100 µl des bei der Zentrifugation entstandenen Überstands wurde für die MPO-Messung eingesetzt.

Für den Leerwert wurden 100 µl der Überstände mit Phosphatpuffer und O-Dianisidine Dihydrochlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) versetzt. Im Falle der Proben und der Standardwerte wurde zusätzlich H₂O₂ hinzugegeben.

Es wurde auf Zeit pipettiert (zum Beispiel alle 20 Sekunden) und exakt nach 20 Minuten mit der Messung am Photometer (Ultrospec Plus, Pharmacia, Freiburg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 460 nm begonnen. Mit Hilfe der Absorption konnte die Leukozytenanzahl/mg Gewebe der Standardkurve entnommen werden.

2.3.9 PECAM-1-Färbung

Für die histologischen und immunchemischen Untersuchungen wurden aus dem entnommenen Gewebe der verschiedenen Areale (Kontrolle, Infarkt und AAR) 5 µm dünne Kryoschnitte angefertigt.

Für die PECAM-Färbung wurde zunächst 2M HCL-Lösung für 20 Minuten auf die Schnitte gegeben und diese dann in einem Wärmeschrank (37°C) gelagert. Anschließend wurden die Schnitte 3x 5 Minuten mit PBS + 0,2% Tween gewaschen.

Um die unspezifische Proteinbindung zu minimieren, wurde als nächstes das Serum-blocking mit Antibody diluent (Dako, Glostrup, Dänemark) für 30 Minuten bei RT durchgeführt. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschgang mit PBS + 0,2% Tween für 3x 5 Minuten.

Es wurde dann der primäre Antikörper gegen PECAM-1 (PECAM-1 goat polyclonal IgG, sc-1506, Santa Cruz, CA, USA) in 1:20-facher Verdünnung mit Antibody diluent hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht in einem lichtgeschützten Raum. Nach 3x 5 Minuten Waschen mit PBS + 0,2% Tween konnte der sekundäre Antikörper (Donkey anti-goat IgG, Sc-2094, Fits-konjugiert, Santa Cruz, CA, USA) in 1:50-facher Verdünnung mit Antibody diluent hinzugegeben werden. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei RT erneut lichtgeschützt. Nach erneutem Waschgang (3x 5 Minuten PBS + 0,2% Tween) konnten die Schnitte bei 4°C lichtgeschützt bis zur Analyse gelagert werden.

Die Schnitte wurden mit dem Axiovert 200M-Mikroskop angeschaut. Die Bilder wurden mit einer AxioCam aufgenommen und anschließend analysiert.

2.3.10 TUNEL-Färbung

Als Nachweis apoptotischer Zellen diente die TUNEL(TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)-Färbung mit Hilfe des ApopTag Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kits (Millipore, Temecula, USA).

Die bei der Apoptose entstandenen Fragmente können mit der TUNEL-Färbung sichtbar gemacht werden. Die terminale Desoxynucleotidyl Transferase (TdT) [111] hängt an die frei werdenden Hydroxygruppen der Fragmenten am 3' Ende (3'OH-Gruppe) mit Digoxigenin-markierte Nukleotide. Ein mit einem fluoreszierenden Farbstoff konjugierter Anti-Digoxigenin-Antikörper macht die Fragmente sichtbar.

Die Fixierung der Kryoschnitte erfolgte durch 10-minütige Inkubation mit 1%-igem Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland). Nach anschließendem Waschen

mit 1%-iger PBS wurden die Zellen mit einem vorgekühlten 2:1 Ethanol/Essigsäure-Gemisch (Roth, Karlsruhe, Deutschland) permeabilisiert.

Um die Wirksamkeit des Enzyms zu erhöhen, wurde vor dessen Zugabe der Equilibrierungspuffer hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch und der Digoxin Antikörper wurden gemäß Angaben des Herstellers hinzugegeben und inkubiert.

Nach einem letzten Waschvorgang wurden die Gewebeproben schließlich mit Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, USA) unter Deckgläschen eingebettet, um die Zellkerne fluoreszierend zu markieren. Diese enthält DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) zur Gegenfärbung von DNA.

Der Negativkontrolle wurde statt des Tdt-Enzyms PBS hinzugefügt. Die Positivkontrolle wurde nach Fixierung für eine Stunde mit der DNase 1 behandelt, um DNA-Strangbrüche zu induzieren.

Die Auswertung erfolgte mithilfe des Fluoreszenzmikroskops (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei 40-facher Vergrößerung.

2.4 Statistik

Die Daten wurden mit Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation Seattle, USA) und SPSS (SPSS 11.0.1, SPSS Inc., Chicago, USA) analysiert. Es wurden stets Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SEM) angegeben. Es wurde ein einseitiger ANOVA(Analysis of variance)-Test auf signifikante Abweichungen durchgeführt. Als signifikantes Ergebnis galt $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1 hHO-1- Nachweis

3.1.1 Western Blot

Der Nachweis der hHO-1-Expression in den Zellen erfolgte mit Hilfe des Immunoblots. Nach Aufbereitung der Zellen zeigte sich in der mit einem hHO-1-Plasmid transfizierten stabilen HL-1-Reihe im Vergleich zu unbehandelten HL-1-Zellen eine deutliche Zunahme der Expression des Proteins (siehe Abb. 6).

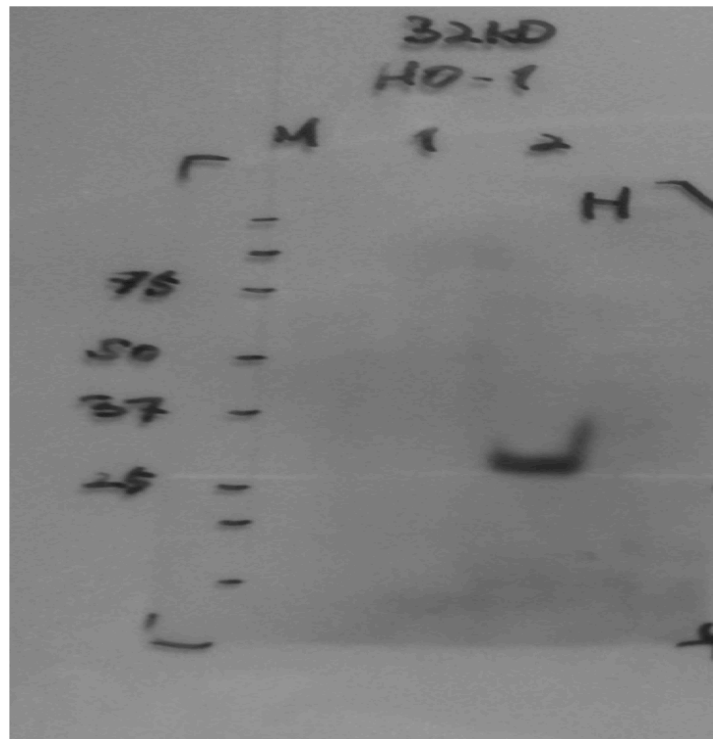


Abb. 6: Western Blot zum hHO-1- Nachweis. In mit hHO-1 transfizierten HL-1-Zellen zeigt sich im Gegensatz zu untransfizierten Zellen eine Bande bei 32 kD, welches der Molekularmasse des hHO-1 entspricht. M=Marker, 1= untransfizierte HL-1-Zellen als Kontrolle, 2= mit hHO-1 transfizierte HL-1-Zellen.

3.1.2 QT-PCR

PCR-Analysen zeigten eine signifikante Steigerung der hHO-1-Expression in transgenen und rAAV-behandelten Tieren. Im Kontrollareal war die hHO-1-mRNA-Expression der transgenen Tiere neunmal und der rAAV-Tiere siebenmal so groß wie die mRNA-Expression der Kontrolltiere (siehe Abb. 7).

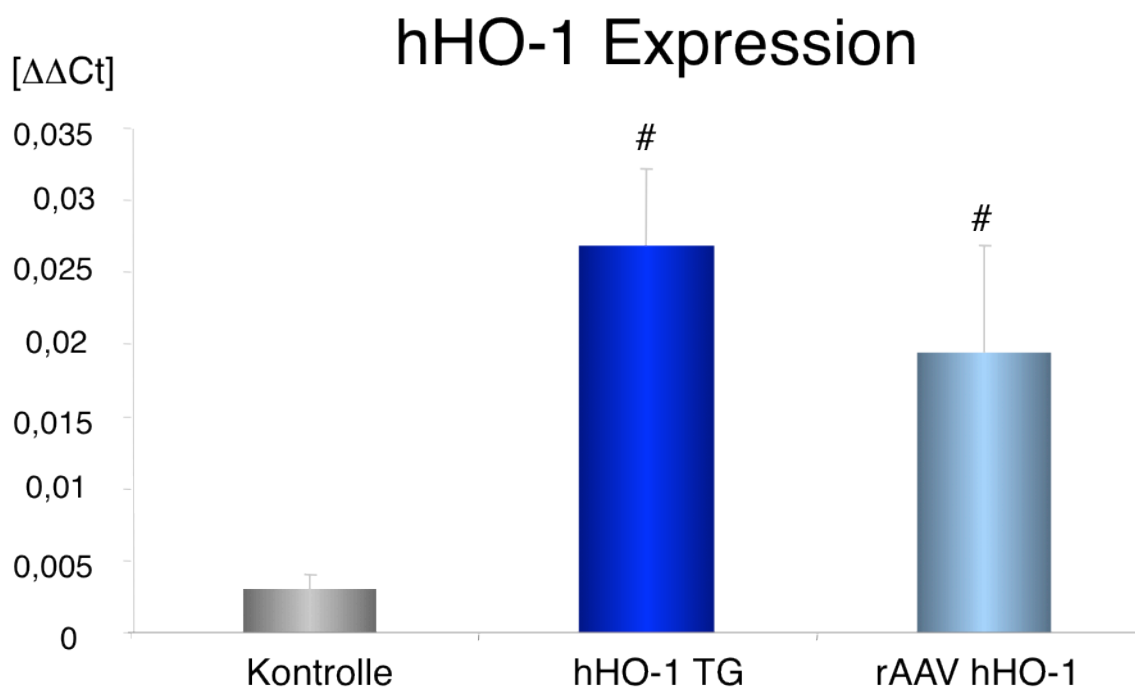


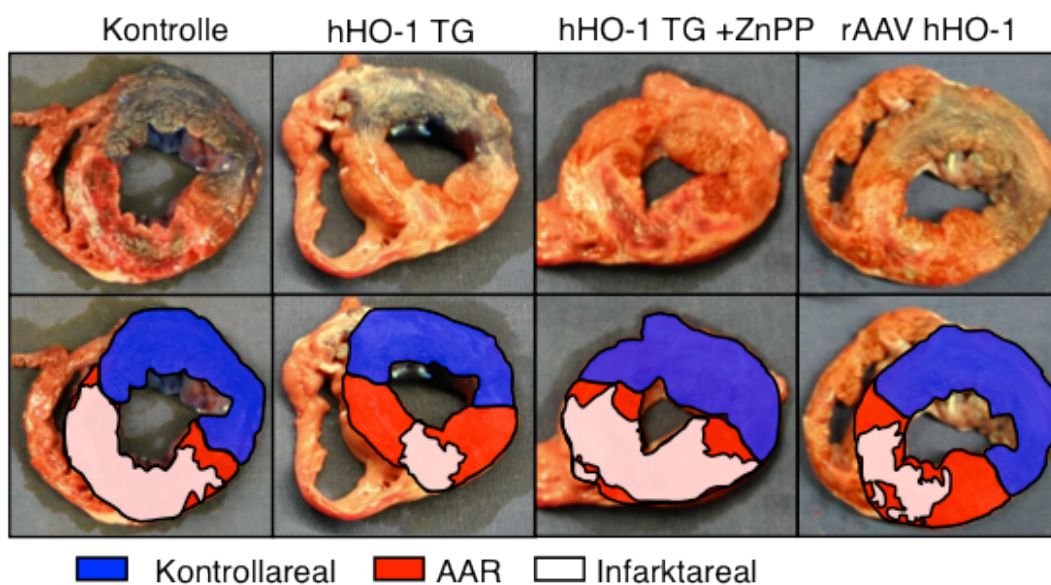
Abb. 7: PCR-Analysen der hHO-1-Expression im Kontrollareal der Schweineherzen. Die Differenz der Ct-Werte der hHO-1-Expression und der GAPDH-Expression zur Quantifizierung (vgl. 2.1.4); n=3/Gruppe, MW± SEM; #: p< 0,05 Kontrolle vs. hHO-1 TG und rAAV hHO-1

3.2 Infarktgröße und Größe der AAR

Wie oben beschrieben erfolgte die Flächenmessung digital. Mit Hilfe der Methylenblaufärbung und der Gegenfärbung mit dem Vitalfarbstoff Tetrazoliumrot stellte sich das Kontrollgebiet blau dar, die AAR rot und das Infarktgebiet blieb ungefärbt (siehe Abb. 8A). Die Infarktgröße wurde als Anteil der AAR angegeben.

Die Infarktgröße in der Kontrollgruppe betrug $58,28\% \pm 4,07$. Mit einer Infarktgröße von $36,3\% \pm 2,36$ in der Gruppe der transgenen Schweine und einer Ausdehnung des Infarkts von $45,22\% \pm 1,54$ in der rAAV-behandelten Gruppe konnte die Infarktgröße mit hHO-1-Überexpression signifikant reduziert werden. In der Inhibitorgruppe wurde der positive Effekt der hHO-1-Überexpression aufgehoben. Die Infarktausdehnung betrug dort $60,73\% \pm 3,10$ (siehe Abb. 8B).

Um sicherzustellen, dass das primär gefährdete Areal sich in den einzelnen Gruppen nicht unterschied, wurde die Ausdehnung der AAR ebenfalls untersucht. Sie wurde im Verhältnis zum gesamten linken Ventrikel gesetzt. Abb. 8C zeigt, dass keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen Gruppen vorlagen (Kontrolle: $53,45\% \pm 1,54$; Transgene: $56,14\% \pm 1,63$; rAAV: $58,37\% \pm 1,28$; Inhibitor: $54,38\% \pm 3,06$).

A

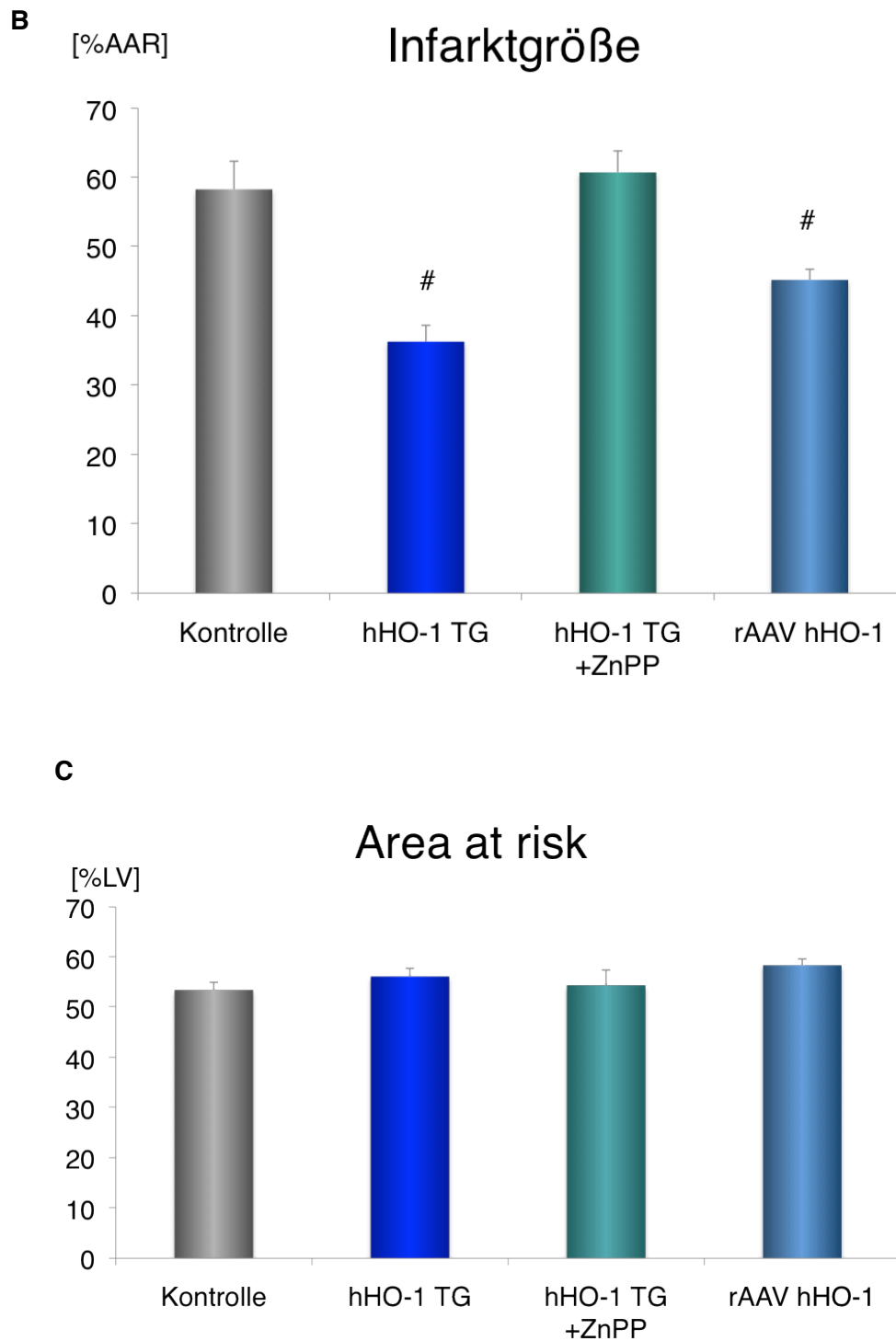


Abb. 8: Planimetrische Bestimmung der Infarktgröße und Größe der AAR 24 Stunden nach Ischämie und Reperfusion. **A** Beispielbilder zur farblichen Differenzierung zwischen AAR, Kontroll- und Infarktareal. **B** Signifikanter Unterschied der Infarktgröße in transgenen (TG) und mit AAV-behandelten Tieren (rAAV hHO-1) im Vergleich zur Kontrolle. **C** Die Ausdehnung der AAR unterscheidet sich in den einzelnen Gruppen nicht signifikant. MW \pm SEM; #: $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

3.3 Inflammation

Die Abschätzung der Leukozyteninfiltration ergab in der Kontrollgruppe 2163/ mg Gewebe \pm 589. Demgegenüber ergab sich eine Reduktion der Leukozytenzahlen in der AAR bei den transgenen Tieren (1151/ mg Gewebe \pm 152) und den mit rAAV behandelten Tieren (1091/ mg Gewebe \pm 208). In der Inhibitorgruppe zeigte sich eine Leukozyteninfiltration von 2219/ mg Gewebe \pm 438. Noch deutlicher machten sich die Unterschiede im Infarktareal bemerkbar, wobei die MPO-Aktivität in den einzelnen Gruppen im Infarktareal höher als im Kontrollgebiet und der AAR war. In der Kontrollgruppe wurden mit dem MPO-Assay 10.016 Leukozyten/ mg Gewebe \pm 1.318 nachgewiesen. Die hHO-1-Überexpression führte zu einer Reduktion der Leukozytenkonzentration im Gewebe bei den transgenen (5.016/ mg Gewebe \pm 1.224) und rAVV-behandelten Tieren (5.405/ mg Gewebe \pm 1.318). Die Retroinfusion von ZnPP führte bei den transgenen Schweinen zu einem erneuten Anstieg der Werte (10.368/ mg Gewebe \pm 1.680).

Im Kontrollgebiet unterschieden sich die einzelnen Gruppen in der MPO-Aktivität nicht signifikant (Kontrolle: 793/ mg Gewebe \pm 132; Transgene: 916/ mg Gewebe \pm 108; rAAV: 968/ mg Gewebe \pm 190; Inhibitor: 944/ mg Gewebe \pm 62).

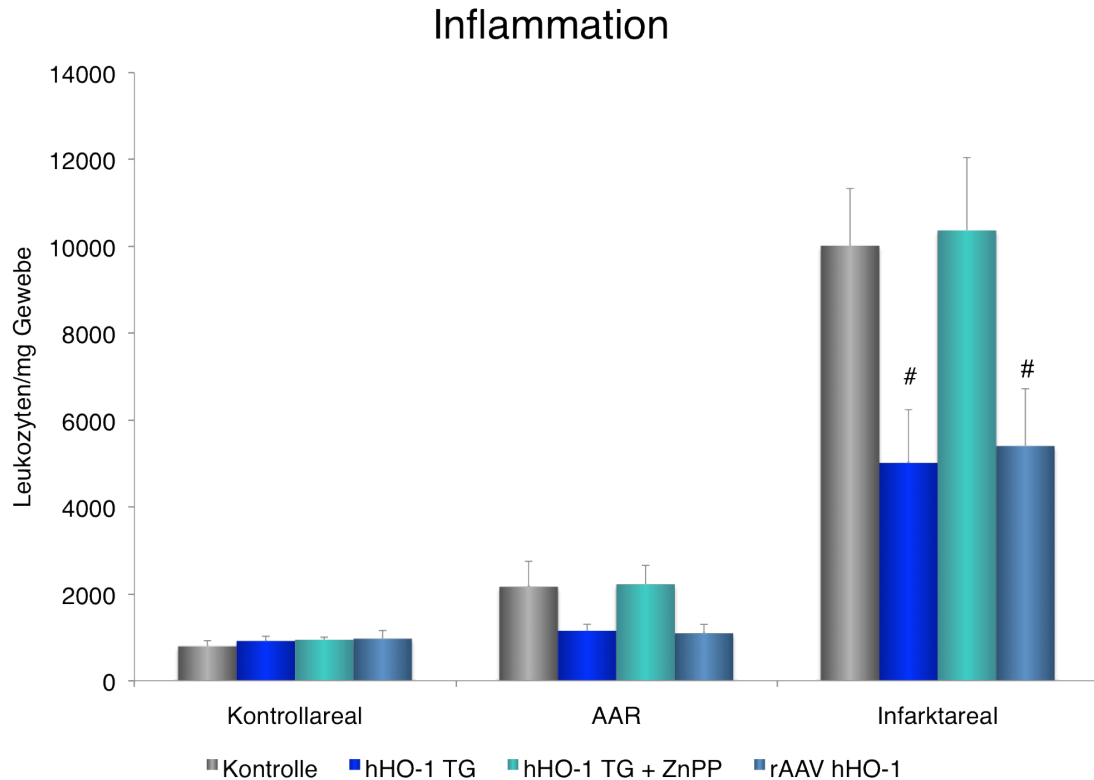


Abb. 9: Inflammation anhand des Myeloperoxidase-Assays. Im Infarktgebiet zeigte sich bei hHO-1-Überexpression eine Reduktion der Leukozyten im Gewebe. MW \pm SEM; #: $p < 0,05$ vs. Kontrolle

3.4 Apoptose

Die TUNEL-Färbung des Gewebes erfolgte sowohl in der AAR als auch im Kontrollgebiet der RCX. Die Angaben der apoptotischen Zellen erfolgten in Prozent der gezählten Zellkerne.

Im Kontrollareal unterschieden sich die einzelnen Gruppen nicht signifikant. Ein deutlicher Anstieg der apoptotischen Zellen im Gewebe der Kontrolltiere ($7,54\% \pm 0,75$) im Vergleich zu den transgenen ($0,41\% \pm 0,17$) und rAAV-retroinfundierten ($1,00\% \pm 0,25$) Tieren stellte sich in der AAR dar. In der Inhibitorgruppe zeigten sich $10,53\% \pm 0,73$ apoptotische Zellen in der AAR (siehe Abb. 10).

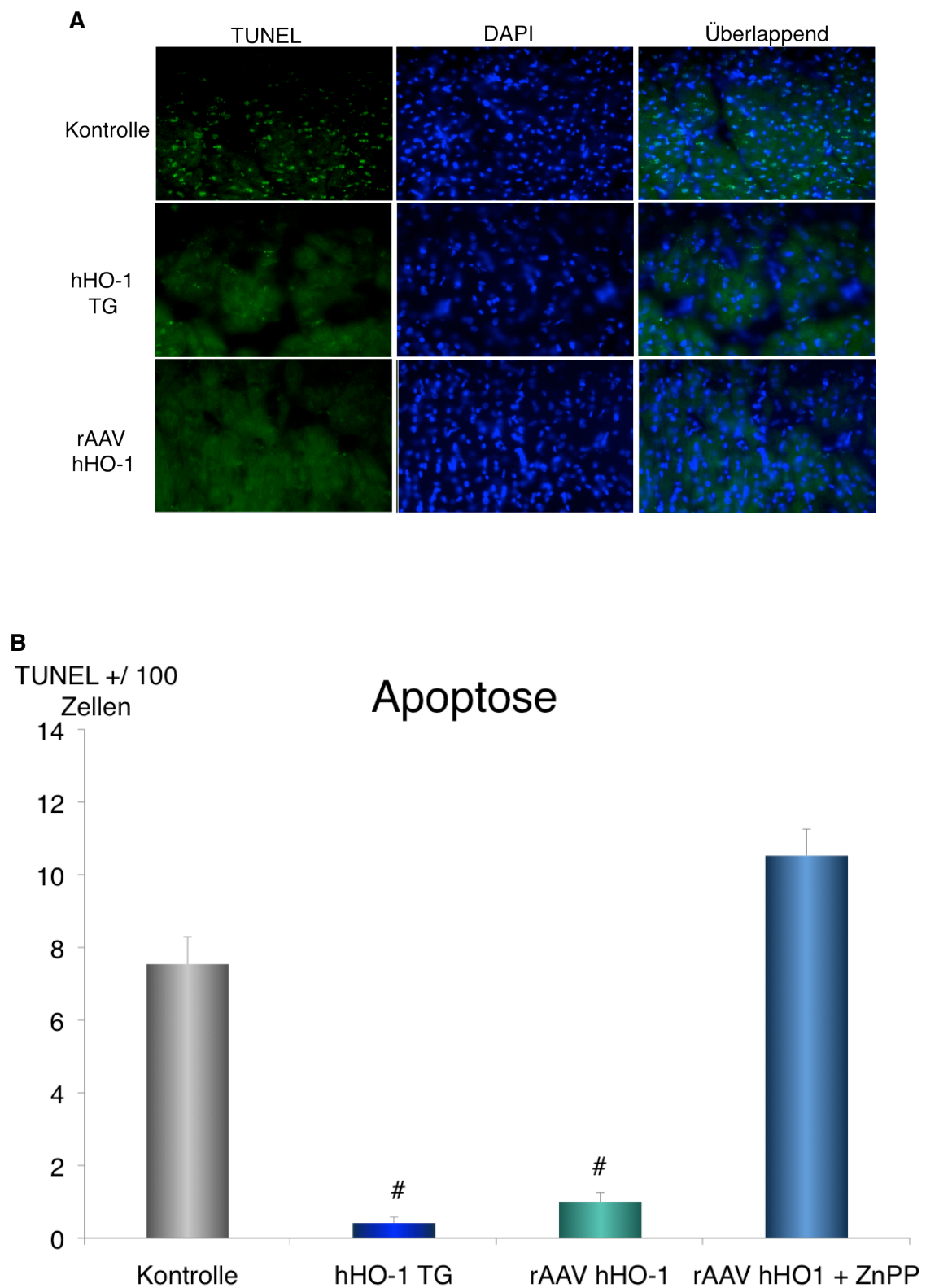


Abb. 10: Apoptoserate anhand der TUNEL-Färbung. **A** Beispielbilder aus dem Ischämiegebiet. Die Zellkerne wurden mit DAPI dargestellt. **B** TUNEL-positive Zellen/100 Zellkerne im Infarktareal. Signifikante Reduktion der Apoptoserate nach hHO-1-Überexpression MW± SEM; #: $p < 0,05$ vs. Kontrolle

3.5 Globale Herzfunktion

3.5.1 Ejektionsfraktion

Zur Beurteilung der globalen Herzfunktion im Verlauf wurde die Ejektionsfraktion (EF) vor Ischämie sowie 24 Stunden nach Reperfusion bestimmt (siehe Abb. 11). Vor der Ischämie unterschieden sich die einzelnen Gruppen nicht signifikant in ihrer Herzfunktion. Nach einstündiger Ischämie war die linksventrikuläre Auswurfraction (Ejektionsfraktion) in der Gruppe der transgenen Schweine und rAAV-behandelten Schweine signifikant höher als in der Kontrollgruppe und in der Gruppe mit ZnPP behandelten hHO-1-überexpmierenden Schweine. Die EF der Kontrollgruppe fiel postischämisch von $53,15\% \pm 1,63$ auf $26,12\% \pm 3,03$. In der transgenen Gruppe stellte sich die Abnahme der EF postischämisch signifikant kleiner dar: Vor der Ischämie wiesen die Tiere eine EF von $58,23\% \pm 1,43$ auf, nach der Ischämie betrug die EF noch $41,06\% \pm 1,64$.

Die mit dem hHO-1 rAAV behandelten Tiere präsentierten zu Beginn eine EF von $55,73\% \pm 0,36$. Nach der Ischämie betrug sie noch $40,51\% \pm 3,23$.

Die postischämische EF der hHO1-überexpmierenden Schweine mit Retroinfusion von ZnPP war signifikant geringer als die EF der transgenen Schweine ohne Retroinfusion: Die EF fiel von $52,14\% \pm 1,06$ auf $28,89\% \pm 0,87$.

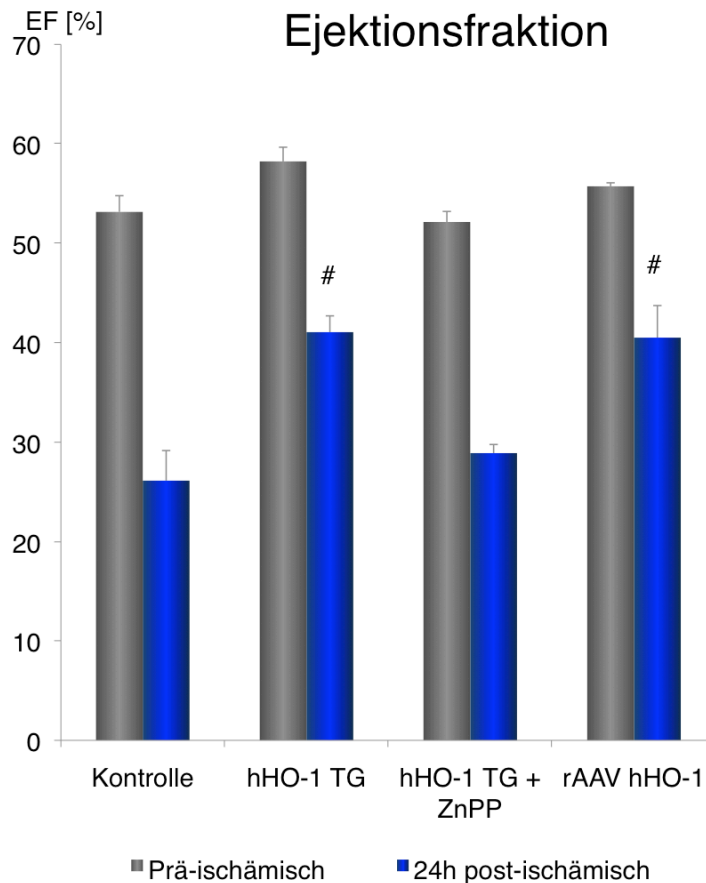


Abb. 11: Linksventrikuläre Auswurffrac­tion (EF) zur Bestimmung der globalen Herzfunktion. Die postischämische Abnahme der EF ist bei erhöhtem hHO-1-Expressionslevel signifikant geringer ausgeprägt. MW \pm SEM; #: $p < 0,05$ vs. Kontrolle

3.5.2 Linksventrikulärer enddiastolischer Druck

Als weiterer Indikator der globalen Herzfunktion diene der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) vor und nach Ischämie (siehe Abb. 12). In der Kontrollgruppe stieg der enddiastolische Druck im linken Ventrikel von anfänglich 9,00 mmHg \pm 0,88 postischämisch auf 11,88 mmHg \pm 1,43. Eine ähnliche signifikante Steigerung zeigte sich auch in der Gruppe der transgenen Tiere mit ZnPP-Retroinfusion: Vor der Ischämie betrug der LVEDP 8,82 mmHg \pm 0,20, nach der Ischämie war der LVEDP auf 12,51 mmHg \pm 0,72 gestiegen. Der LVEDP der transgenen beziehungsweise rAAV-behandelten Tiere änderte sich postischämisch (9,17 mmHg \pm 0,42 beziehungsweise 9,36 mmHg \pm 0,16) gegenüber den Ausgangswerten (8,70 mmHg \pm 0,50 bzw. 8,00 mmHg \pm 0,19) nicht signifikant.

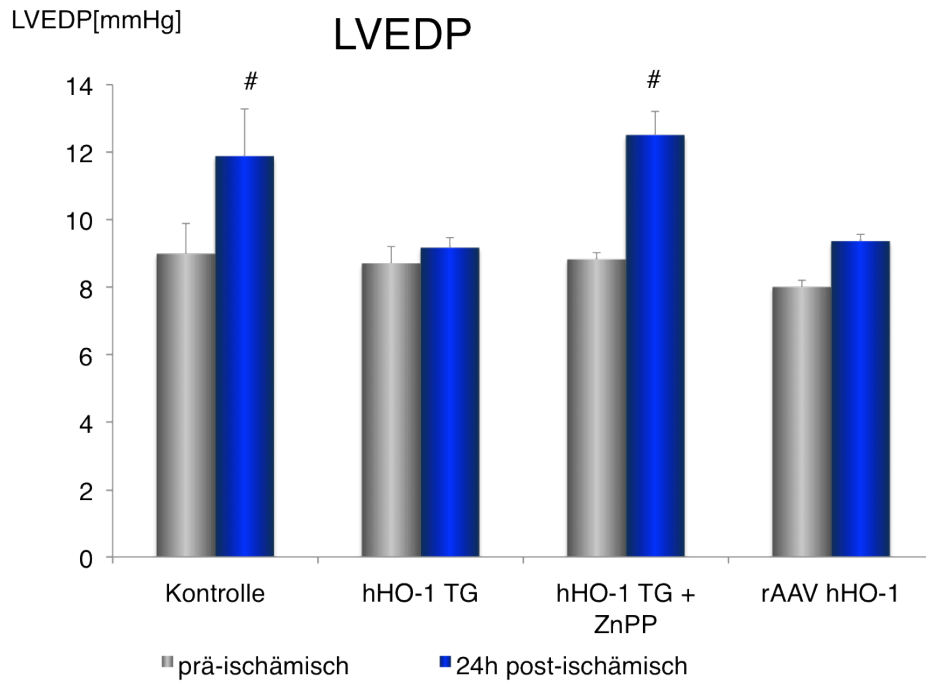


Abb. 12: Linksventrikulärer enddiastolischer Druck als weiterer Indikator der globalen Herzfunktion. Signifikanter postischämischer Anstieg des enddiastolischen Drucks im linken Ventrikel in der Kontroll- und Inhibitorgruppe. MW \pm SEM, #: $p < 0,05$ vs. Kontrolle und hHO-1 TG + ZnPP.

3.6 Regionale Herzfunktion

Als regionale Herzfunktion diente die subendokardiale Segmentverkürzung (SES). Sie wurde für die AAR, das Kontroll- und Infarktareal mit oben genannter Formel berechnet (siehe Seite 44). Das Ergebnis des Infarktgebiets wurde mit der Segmentverkürzung des Kontrollgebiets der RCX in Relation gesetzt und in Prozent angegeben.

Die Messungen erfolgten in Ruhe und Schrittmacher-induziert bei 120 und 150 Schlägen pro Minute. Sowohl in Ruhe als auch unter Pacing ergab sich für die transgenen Schweine im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant größere Segmentverkürzung. In Ruhe zeigte sich bei den transgenen Schweinen eine Segmentverkürzung von $58,14\% \pm 11,76$. In der Kontrollgruppe betrug sie nur $25,26\% \pm 5,24$. Bemerkbar machte sich der Unterschied vor allem bei erhöhter Herzleistung. Bei einer Herzfrequenz (HF) von 120/ min konnte man eine Myokardfunktion des RCX-perfundierten Referenzareals von $52,50\% \pm 8,44$ feststellen, bei einer HF von 150/ min präsentierten die transgenen Schweine eine Segmentverkürzung von $44,05\% \pm 8,14$,

wohingegen die Kontrolltiere eine Segmentverkürzung von nur noch $16,03\% \pm 16,39$ beziehungsweise $1,69\% \pm 3,65$ des Kontrollgebietes aufwiesen.

Nach der Retroinfusion des hHO-1-Inhibitors ZnPP erreichte die regionale Herzfunktion in den hHO-1-überexprimierenden Tieren in Ruhe das gleiche Niveau wie die der Kontrolltiere ($23,52\% \pm 2,61$). Deutlich schlechtere Funktionswerte machten sich bei 120 Schlägen pro Minute ($-0,26\% \pm 6,25$) und 150 Schlägen pro Minute ($-3,49\% \pm 5,21$) bemerkbar.

Die Myokardfunktion der rAAV-behandelten Tiere unterschied sich in Ruhe nicht signifikant von den Kontrolltieren ($30,37\% \pm 3,49$). Erst unter Pacing verbesserte sich die Funktion in Relation des RCX-perfundierten Referenzareals: Bei einer HF von 120/min stieg die Leistung auf $33,34\% \pm 3,13$ an, bei einer HF von 150/min betrug sie sogar $36,44\% \pm 3,86$.

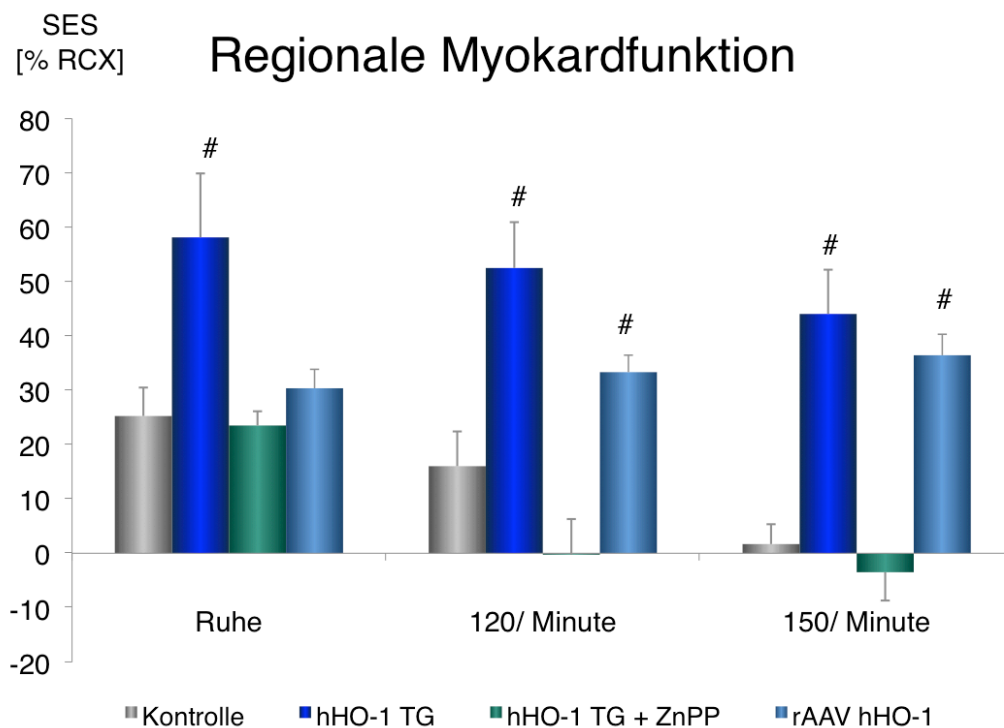


Abb. 13: Regionale Myokardfunktion anhand der subendokardialen Segmentverkürzung des Infarktareals in Relation zum Kontrollgebiet der RCX. Vor allem bei erhöhter Herzfrequenz größere Segmentverkürzung in transgenen und rAAV-behandelten Tieren. MW \pm SEM; #: $p < 0,05$ vs. Kontrolle

3.7 Beobachtungen zum Einfluss des hHO-1-Expressionslevels auf den Ischämie-Reperfusionsschaden

Um Hinweise auf den Einfluss des hHO-1-Expressionslevels zu bekommen, wurden drei transgene Schweine mit unterschiedlicher hHO-1-Dosis in einige funktionelle Untersuchungen miteinbezogen.

Mit steigender hHO-1-Expression nahm die Infarktgröße ab. In dem Tier mit der niedrigsten hHO-1-Dosis betrug die Ausdehnung des Infarktes 54,65%. Bei mittlerer hHO-1-Expression nahm die Infarktgröße bereits auf 47,23% ab. Das Tier mit der größten hHO-1-Expression wies eine Infarktgröße von nur noch 40,72% auf.

Die Analyse der Ejektionsfraktion als Parameter für die globale Herzfunktion zeigte, dass eine steigende hHO-1-Expression zu einer Erhöhung der EF 24 Stunden nach Ischämie führte. In dem Tier mit der niedrigsten hHO-1-Dosis betrug die EF vor der Ischämie 54,57% und 24 Stunden nach der Ischämie 32,22%.

Bei mittlerer hHO-1-Expression präsentierte sich eine anfängliche EF von 52,22%, welche 24 Stunden nach der stattgefundenen Ischämie nur noch 35,09% betrug.

Das Tier mit der stärksten hHO-1-Expression zeigte eine Auswurfleistung von 54,40% vor Ischämie und 41,87% 24 Stunden nach Ischämie. Diese war mit der Auswurfleistung der transgenen Tiere vergleichbar (siehe Abb. 14).

Die subendokardiale Segmentverkürzung (SES) im Infarktareal stellte die regionale Herzfunktion dar. Sie wurde in Prozent zur enddiastolischen Länge angegeben. Im Gegensatz zu der regionalen Herzfunktion (angegeben in Relation zum Kontrollgebiet der RCX), beschrieben auf Seite 58-59, wurden hier die absoluten Werte im Infarktareal verwendet.

Das Tier mit der niedrigsten hHO-1-Dosis zeigte in Ruhe eine Segmentverkürzung von 6,69%, welche sich durch Pacing verkleinerte und schließlich bei 150 Schlägen/ min nur noch 3,60% betrug. Das Tier mit einem mittleren hHO-1-Expressionslevel hatte in Ruhe eine SES von 9,60% und einen Abfall auf ebenfalls 3,60% bei 150 Schlägen/ Minute.

Das Tier mit der stärksten hHO-1-Ausprägung präsentierte eine Segmentverkürzung von 14,00% in Ruhe und einem stetigem Abfall bis auf nur 5,10% bei 150 Schlägen/Minute. Dieses Tier war demnach vergleichbar mit den transgenen Tieren.

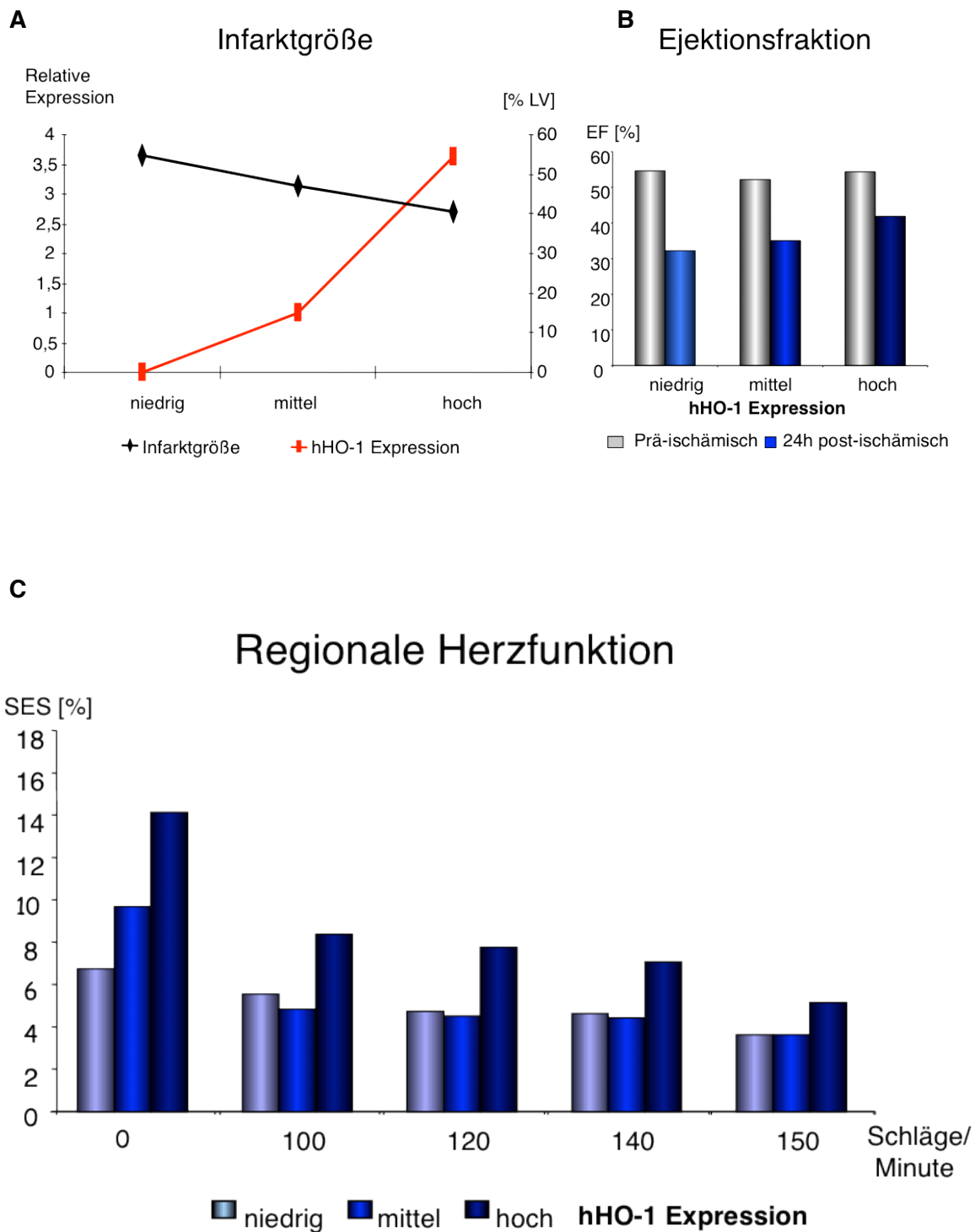


Abb. 14: Analyse unterschiedlicher hHO-1-Expressionslevel. **A** Bei steigendem Expressionslevel sinkt die Infarktgröße. **B** Eine höhere hHO-1-Dosis führt zu einer höheren EF 24 Stunden nach Ischämie. **C** Die SES sowohl in Ruhe als auch unter Pacing ist bei höherer hHO-1-Expression größer.

3.8 Kapillardichte

Um den Einfluss der hHO-1 auf die Mikrozirkulation nach Myokardinfarkt zu demonstrieren, wurde die Kapillardichte in der AAR untersucht

Die Kapillardichte wurde absolut als Anzahl PECAM-1 positiver Zellen in der AAR angegeben.

Die Kapillardichte in den transgenen Tieren war in der AAR mit $103 \pm 3,05$ signifikant höher als in den Kontrolltieren ($48,38 \pm 1,71$). Auch in den rAAV-behandelten Tieren konnte man mit $105,73 \pm 3,20$ eine signifikant höhere Kapillardichte im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachten.

Nach der Behandlung der hHO-1-überexprimierenden Schweine mit ZnPP zeigte sich eine Kapillardichte von $44,16 \pm 1,79$. Sie unterschied sich somit nicht signifikant von der Kontrolle (siehe Abb. 15).

Somit zeigte sich interessanterweise, dass die hHO-1 neben Effekten auf die Kardiomyozyten auch eine Verbesserung der Mikrozirkulation im Infarkttrandgebiet nach Myokardinfarkt nach sich zieht.

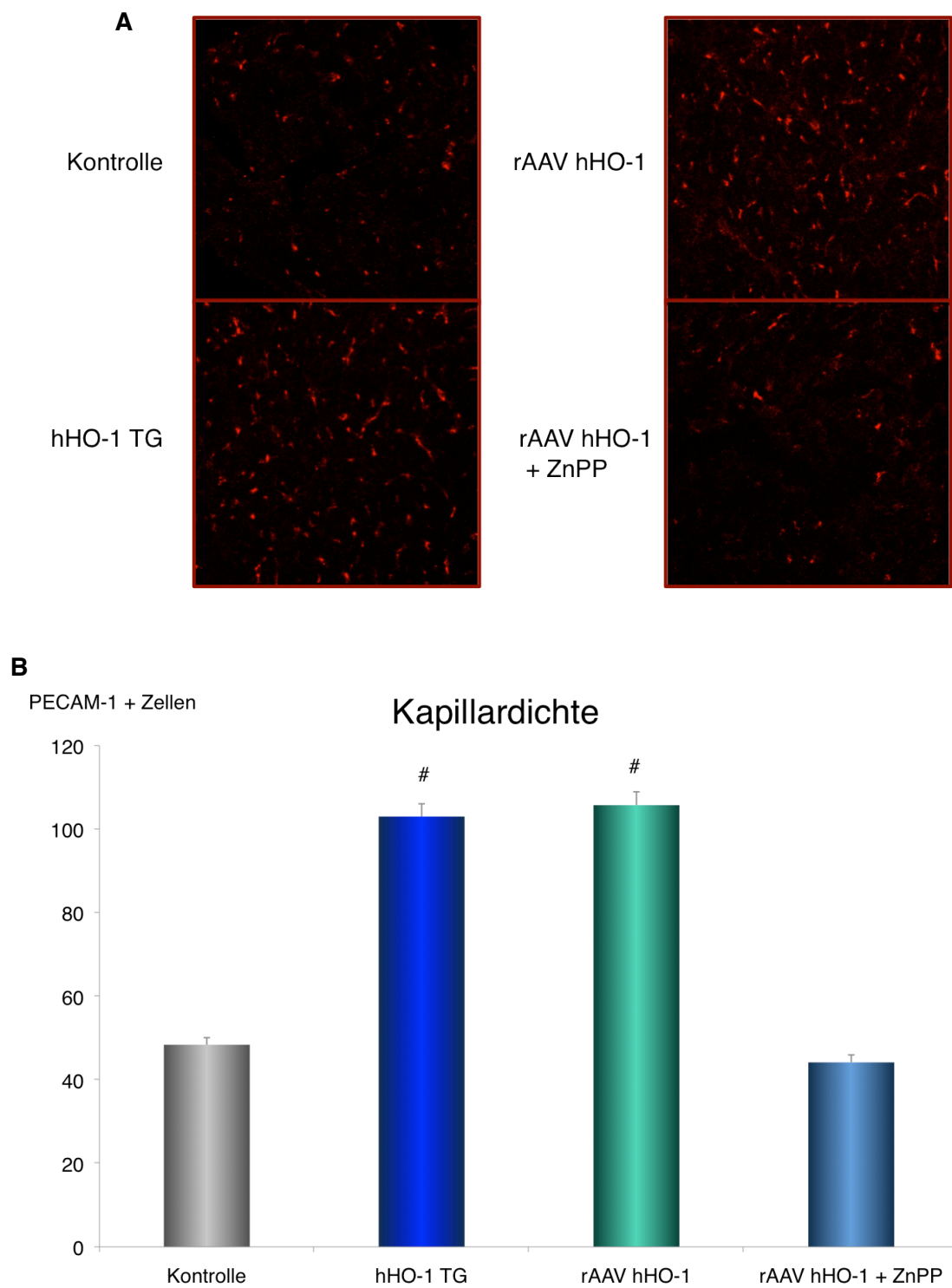


Abb. 15: Kapillardichte in der AAR absolut angegeben. **A** Beispielbilder der PECAM-1-Färbung in der AAR. **B** Die Kapillardichte der transgenen und rAAV-behandelten Tiere ist im Vergleich zur Kontrolle signifikant höher. MW \pm SEM, #: $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

3.9 Apoptose in vitro

3.9.1 Myozytenapoptose

Um den Einfluss der hHO-1 auf die Apoptose in Kardiomyozyten während des Myokardinfarktes festzustellen, wurden nach Hypoxie und Reoxygenation untransfizierte und mit hHO-1 transfizierte HL-1-Zellen auf die Anzahl apoptotischer Zellen untersucht. Apoptotische Zellen färbten sich mit Tryptanblau an. Die Myozytenapoptose wurde prozentual zu der Gesamtzahl der HL-1-Zellen angegeben.

Die Myozytenapoptose betrug in untransfizierten HL-1-Zellen $21,21\% \pm 1,38$. Nach Transfektion mit der hHO-1 sank die Apoptoserate signifikant auf $6,5\% \pm 2,17$.

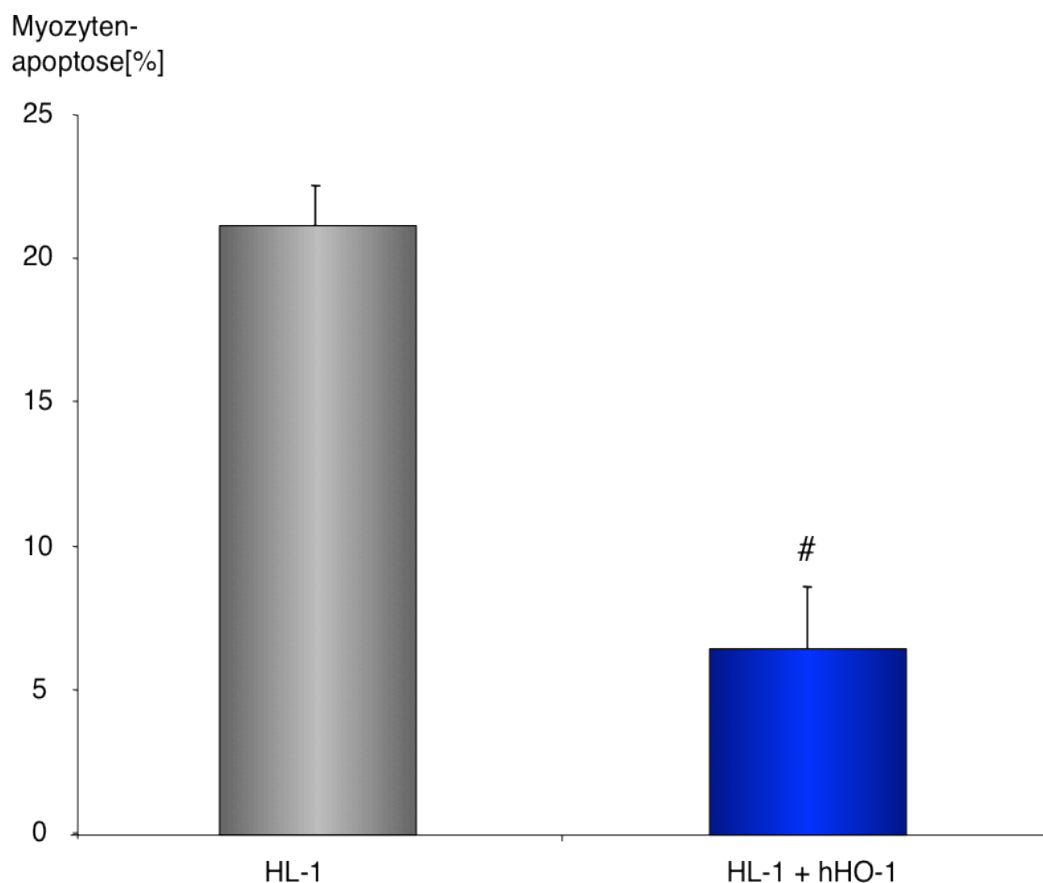


Abb. 16: Myozytenapoptose als Anzahl apoptotischer Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Myozyten. Nach Hypoxie und Reoxygenation nimmt die Apoptoserate in transfizierten Zellen signifikant ab. MW \pm SEM, #: $p < 0,05$ vs. HL-1.

3.9.2 Endothelapoptose

Um einer möglichen Ursache des positiven Effektes auf die Mikrozirkulation nachzugehen, wurde die Apoptose auch in Endothelzellen untersucht.

Die Apoptoserate nach Hypoxie und Reoxygenation wurde anhand der TUNEL-Färbung für Zellen dargestellt. Die apoptotischen Zellen wurden prozentual zu der Gesamtzahl der Zellen angegeben.

Es zeigte sich, dass mit hHO-1 transfizierte humane Endothelzellen eine signifikant niedrigere Apoptoserate ($9,93\% \pm 1,93$) aufwiesen als untransfizierte Endothelzellen ($17,14\% \pm 2,07$).

Nach Zugabe von ZnPP zu transfizierten Zellen stellte sich eine signifikant höhere Apoptoserate ein ($25,36\% \pm 2,91$).

Die reduzierte Endothelapoptose kann also für die erhöhte Mikrozirkulationsdichte mitverantwortlich sein.

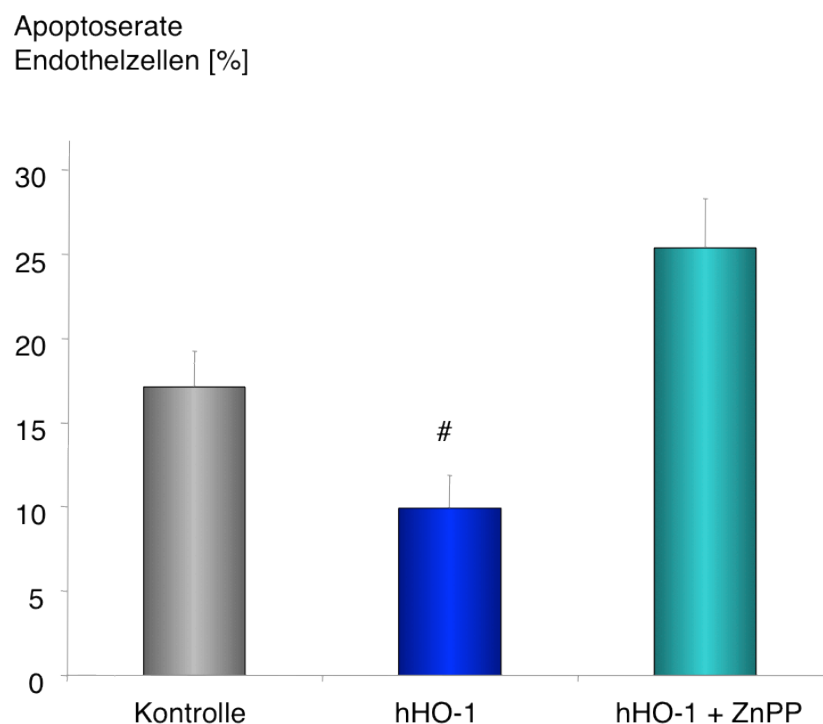


Abb. 17: Apoptoserate in Endothelzellen nach Hypoxie und Reoxygenation. Die prozentuale Anzahl apoptotischer Endothelzellen nimmt nach hHO-1-Transfektion signifikant ab. MW \pm SEM, #: $p < 0,05$ vs. Kontrolle und hHO-1 + ZnPP.

3.9.3 Endothelzellen mit Medium von HL-1-Zellen

In den mit einem myotropen rAAV behandelten Tieren zeigte sich ebenso wie in der transgenen Gruppe ein positiver Einfluss der hHO-1 auf die Mikrozirkulation. Da die hHO-1 in diesen Tieren selektiv in den Kardiomyozyten vermehrt expremiert wurde und die hHO-1 ein intrazelluläres Enzym ist, welches nicht sezerniert werden kann, müssen wir davon ausgehen, dass es einen positiven Effekt von Kardiomyozyten auf Endothelzellen gibt.

Neben dem direkten positiven Einfluss der hHO-1 auf die Endothelzellen könnte ein indirekter Einfluss der Kardiomyozyten auf die Endothelzellen, z.B. mittels ausgeschütteter Faktoren, hierbei eine Rolle spielen.

Daher nutzten wir für diese Untersuchung das Medium von HL-1-Zellen, mit und ohne Transfektion von hHO-1.

Zu ausplattierten HMEC wurde vor Hypoxie und Reoxygenation das Medium von HL-1-Zellen gegeben. Die TUNEL-Färbung kam erneut zum Tragen. Auch hier wurde die Apoptoserate in Anzahl apoptotischer Zellen in Relation zur Gesamtzahl der Zellen angegeben.

Es stellte sich eine deutliche Reduktion der apoptotischen Endothelzellen mit dem Medium von hHO-1 transfizierten Kardiomyozyten ($2,07\% \pm 0,45$) im Vergleich zu denen mit dem Medium von untransfizierten Kardiomyozyten ($9,51\% \pm 1,90$) dar (siehe Abb. 18).

Man kann also davon ausgehen, dass es neben dem direkten Einfluss der Endothelzellen auch einen indirekten Einfluss der transfizierten Kardiomyozyten geben muss.

Apoptoserate
Endothelzellen[%]

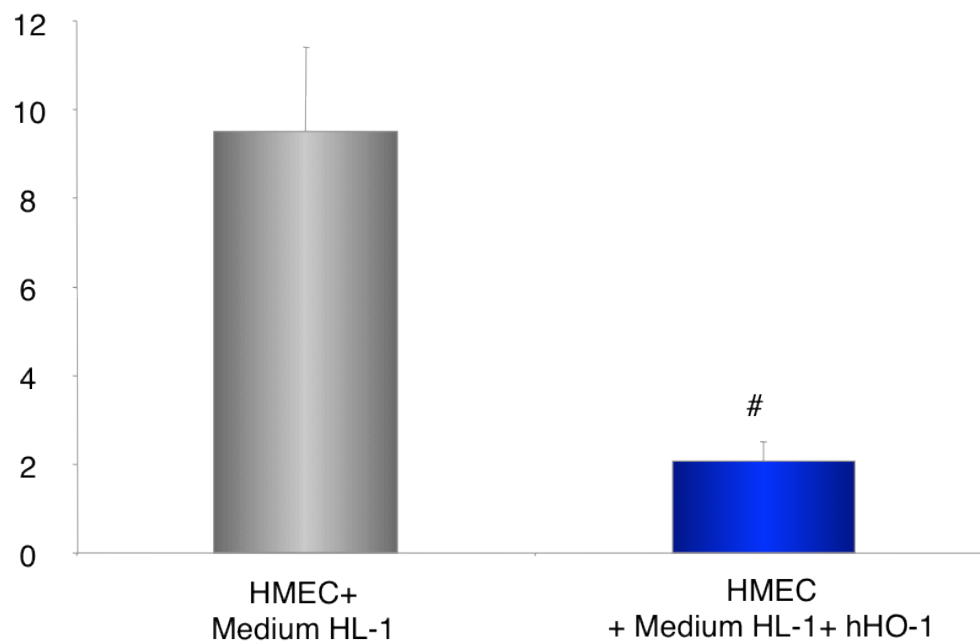


Abb. 18: Apoptoserate in Endothelzellen nach Hypoxie und Reoxygenation. Die Zugabe von Medium transfizierter Kardiomyozyten (HL-1-Zellen) zu ausplattierten HMEC führte zu einer signifikanten Abnahme der Apoptoserate. MW \pm SEM, #: $p < 0,05$ vs. HMEC+ Medium HL-1.

4. Diskussion

4.1 Bedeutung der HO-1 für den Ischämie-Reperfusionsschaden

4.1.1 Kardioprotektive Wirkung der HO-1

Ischämie und Reperfusion führen zum Zellschaden. Durch die Reperfusion sterben vermehrt Zellen ab. In unserem Fall, dem myokardialen Ischämie-Reperfusionsmodell, handelt es sich dabei primär um Kardiomyozyten und Endothelzellen. Dieser induzierte Zellschaden beeinflusst vor allem die Herzfunktion.

Um den letalen Reperfusionsschaden zu minimieren bedarf es eines Therapeutikums mit zytoprotektiver Wirkung. Die hHO-1 und ihre Reaktionsprodukte wirken zytoprotektiv und minimieren somit den Reperfusionsschaden [125-128].

Das Ischämie-Reperfusionsmodell im Rahmen der Koronarischämie ist sehr gut beschrieben. Die Arbeitsgruppe um Victor Dzau konnte bereits einen kardioprotektiven Effekt der HO-1 im Rattenmodell nachweisen [91, 129]. Die Applikation eines hHO-1-enthaltenden AAV einige Wochen vor der 30-minütigen Okklusion der LAD führte zu einer HO-1-Überexpression. Dabei zeigte sich vor allem eine Abnahme der Infarktgröße [91]. Auch die Herzfunktion verbesserte sich durch die HO-1-Überexpression [130].

Studien zur Funktion der HO-1 im Ischämie-Reperfusionsmodell im Rahmen eines Myokardinfarktes gibt es viele, jedoch nur einige wenige am Schweinmodell. Jiang et al [131] arbeiteten mit einem Schweinmodell mit einstündiger Okklusion der LAD. Zur HO-1-Überexpression nutzten sie mesenchymale Stammzellen, die intrakoronar appliziert wurden. Es zeigte sich eine verbesserte Herzfunktion.

Da das Ischämie-Reperfusionsmodell am Schwein in vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe bereits sehr gut etabliert wurde [132], haben wir in dieser Arbeit den Effekt der hHO-1 nach Ischämie und Reperfusion im Schweinmodell untersucht, um nachgewiesene Effekte im Kleintiermodell in das Großtiermodell zu translatieren. Das Schweinmodell hat sich in präklinischen Studien als sehr relevant erwiesen (siehe 4.2.1).

Nach Okklusion der LAD kam es in unserem Ischämie-Reperfusionsmodell im Bereich des verschlossenen Gefäßes zur Infarktbildung. Die Analysen der AAR in Relation zum gesamten linken Ventrikel zeigten keine signifikanten Unterschiede in den verschiedenen Gruppen, sodass die Okklusion auf ungefähr einer Höhe stattgefunden haben muss, und somit die primäre AAR identisch war.

Da die Infarktgröße mit steigender hHO-1-Expression abnahm (siehe Abb. 14A), ist ein protektiver Effekt der hHO-1 oder ihrer Produkte anzunehmen. Die relative Infarktreaktion bei transgenen Schweinen im Vergleich zu Kontrolltieren beträgt circa 38%, die relative Reduktion bei AAV-behandelten Tieren circa 22%. Bei Ratten beziehungsweise Mäusen war die Infarktreaktion um einiges höher [76, 91, 128]. Li et al. zeigten bei Mäusen auch nach einjähriger Expression eines hHO-1-enthaltenden AAV eine relative Infarktreaktion von 75% [133]. Masini et al. [134] zeigten in ihrer Studie, dass eine Behandlung mit dem Hämoxigenase-Induktor Häm in 18 Stunden vor Ischämie und Reperfusion ebenfalls eine signifikante Infarktreaktion erzielte.

Die globale Herzfunktion haben wir anhand des linksventrikulären enddiastolischen Drucks und der Ejektionsfraktion vor und nach Ischämie bestimmt. Eine hHO-1-Überexpression führte nach Ischämie zu einem geringeren linksventrikulären enddiastolischen Druck im Vergleich zur Kontrollgruppe, was als Marker für eine bessere Herzfunktion fungiert. Im Stadium der Herzinsuffizienz wiederum steigt die Vorlast und dementsprechend auch der LVEDP. Auch andere Arbeitsgruppen haben den linksventrikulären Druck als Marker der Herzfunktion gewählt [135]. Tang et al. [136] zeigten in einem Mausmodell, dass eine HO-1-Überexpression im Vergleich zur Kontrolle postischämisch zu einem niedrigeren, linksventrikulären enddiastolischen Druck führt. Auch hier wurde der Druck mithilfe einer Messsonde im linken Ventrikel bestimmt. In unserer Studie zeigte sich die bessere Herzfunktion ebenso, indem mit steigender hHO-1-Expression die Auswurfreaktion nach Ischämie im Vergleich zur Kontrolle zunahm. Dies entdeckten einige andere Arbeitsgruppen [137]. Liu et al. [138] zeigten, dass die linksventrikuläre Auswurfreaktion auch langfristig, nämlich nach eineinhalb und drei Monaten nach Reperfusion bei Ratten, mit HO-1-Überexpression via Adenovirus höher war als bei Kontrollmäusen. Die Ejektionsfraktion bestimmten sie im Gegensatz zu uns mit Hilfe der Echokardiographie. Dies ist eine Methode, welche auch routinemäßig am Patienten angewendet wird, allerdings durchaus sehr vom Untersucher und dem anatomischen Zugang zu dem Herzen des zu Untersuchenden abhängig ist [115]. Es zeigte sich eineinhalb Monate nach Reperfusion eine relative Reduktion im Vergleich zur präischämischen Messung in beiden Gruppen. Die relative

Reduktion in HO-1-überexprimierenden Ratten war aber deutlich geringer (13% gegenüber 40%), und dementsprechend die Herzfunktion besser.

In einer anderen Studie zeigten Liu et al. [130], dass auch ein Jahr nach Ischämie und Reperfusion die Herzfunktion bei Ratten, deren HO-1-Genüberexpression zuvor mittels AAV-2 erreicht wurde, im Vergleich zu Kontrolltieren (Gentransfer mittels LacZ-Gen, welches das Enzym β -Galactosidase kodiert) deutlich besser war. Mittels Echokardiographie wurden hierfür verschiedene Parameter wie die Größe des linken Ventrikels nach Diastole oder Systole, die Dicke der Ventrikelwände, aber auch die Drücke und Volumina in den Ventrikeln sowie die linksventrikuläre Auswurfraction herangezogen. Die HO-1-überexprimierenden Ratten zeigten eine Ejektionsfraction, die dem Ausgangsbefund ähnelte. In Kontrolltieren war die Auswurfleistung deutlich reduziert. Der linksventrikuläre enddiastolische Druck war in HO-1-überexprimierenden Ratten etwas niedriger als bei den Kontrollen. Diese Arbeit zeigte einen positiven Langzeiteffekt, der im Hinblick auf Risikopatienten interessant sein könnte. In dieser Studie wurden viele Parameter untersucht, die letztlich alle die globale Herzfunktion widerspiegeln. In anderen Studien wurden zusätzlich auch Herzfrequenz, koronarer Blutfluss und Aortenfluss als Parameter der Herzfunktion genutzt [139]. Der Blutfluss ist allerdings auch von anderen Faktoren als nur von der Herzfunktion abhängig. Dazu gehört zum Beispiel der Gefäßstatus.

Wir haben zusätzlich die regionale Herzfunktion in Form der Segmentverkürzung untersucht. Dabei wird deutlich, wie stark die lokale Bewegung und Funktion des Herzmuskels in einem bestimmten Bereich ist. Diese ist lokal im Infarktbereich eingeschränkt. Die regionale Herzfunktion wurde von der hHO-1 in unseren Untersuchungen ebenfalls positiv beeinflusst. Die Segmentverkürzung im Infarktbereich wurde in Ruhe, als auch unter Pacing mit steigender hHO-1-Expression erhöht. An dieser Stelle können unsere Ergebnisse schlecht verglichen werden, denn diese Methode wurde in anderen Studien zur kardioprotektiven Funktion der hHO-1 so nicht durchgeführt. Es wurde zwar in einigen Studien das „Fractional Shortening“ berechnet [140], welches das Verhältnis zwischen Ventrikeldurchmesser in der Diastole zur Abnahme des Durchmessers in der Systole darstellt. Dieses spiegelt aber die Funktion des gesamten Herzens wider und ist nicht mit unserer Segmentverkürzung, die mit Ultraschallkristallen gemessen wurde, vergleichbar. Diese wurde in anderen Großtierstudien unserer [98, 107] oder anderer Arbeitsgruppen [141, 142] bereits früher als Parameter der regionalen Herzfunktion angewendet.

Die Infarktgröße wird also durch die hHO-1 reduziert. Ebenfalls werden die Schlagkraft und die Leistung des Herzens von der hHO-1 positiv beeinflusst. Es ist noch unklar, ob die hHO-1 selbst oder ihre Nebenprodukte hauptsächlich für die Kardioprotektion verantwortlich sind. In den bislang genannten Studien wurde die HO-1 als solche untersucht. Es gibt aber auch Untersuchungen, die zeigen, dass CO [143-145] oder Bilirubin [76, 146] alleine eine kardioprotektive Wirkung haben. Auf der anderen Seite wird CO als exogenes Gas immer noch als gesundheitsschädigend eingestuft [147]. In einigen Studien zeigte sich sogar ein Gewebeschaden am Herzen, der entweder durch erhöhte Herzenzyme oder ein pathologisches EKG nachgewiesen wurde [148, 149]. Dieser Widerspruch begründet sich wahrscheinlich auf unterschiedliche Konzentrationen des COs. In hohen Mengen wie im Rahmen einer CO-Vergiftung oder auch einer chronischen CO-Exposition wirkt CO toxisch. In kleinen Mengen, wie sie auch physiologisch im Körper vorkommen, kann CO eine protektive Wirkung auf Kardiomyozyten entfalten [150].

Wir haben des Weiteren gezeigt, dass der hHO-1-spezifische Inhibitor ZnPP den positiven Effekt auf das Herz aufhebt. So waren Infarktgröße und Herzfunktion nach Zugabe von ZnPP vergleichbar mit der Kontrollgruppe. Auch in der Literatur ist beschrieben, dass ZnPP die protektive Wirkung der hHO-1 aufhebt [134, 151, 152].

Auf welche Weise die HO-1 kardioprotektiv wirkt, ist bisher noch nicht sicher. Es scheinen hierbei aber vor allem die anti-inflammatorische und anti-apoptotische Wirkung einen protektiven Effekt auf den Herzmuskel zu haben. Im Weiteren werden wir diese wichtigen Eigenschaften der HO-1 näher beleuchten.

Auch wenn wir, so wie einige andere Arbeitsgruppen, einen kardioprotektiven Effekt der hHO-1 im Ischämie-Reperfusionsmodell feststellen konnten, bleibt unklar, wie der Effekt im Menschen sein wird. Im Hinblick auf das Ischämie-Reperfusionsmodell wurden bei protektiver Postkonditionierung in einem vergleichbaren Modell erhebliche Unterschiede in der Infarktreaktion zwischen Tieren und Menschen festgestellt [153, 154]. Dafür gibt es verschiedene mögliche Gründe. Bei den Tieren handelt es sich in den meisten Studien ausschließlich um gesunde Tiere. In den klinischen Studien leiden vor allem Patienten häufig an einem Herzinfarkt, die bereits einige kardiovaskuläre Risikofaktoren wie zum Beispiel Diabetes mellitus, Arteriosklerose, hohes Alter oder schlechten Ernährungszustand aufweisen [155, 156]. Wegen ihrer bestehenden Komorbiditäten nehmen die Patienten einige Medikamente ein, die negative Einflüsse auf die Kardioprotektion in der jeweiligen Studie haben könnten. In Tiermodellen werden diese Medikamenteninteraktionen vernachlässigt [124]. Außerdem ist die

Stärke und Ausprägung des Infarktes im menschlichen Herz sehr variabel und schwer zu beeinflussen oder gar zu kontrollieren [157]. In den tierexperimentellen Studien hingegen findet auf bestimmte Zeit eine komplette Okklusion eines Gefäßes mit Hilfe eines Ballons statt. In klinischen Studien hat man auf den Verschluss des Gefäßes keinen Einfluss, weil Patienten erst mit einem bestehenden Herzinfarkt in die Studie eingeschlossen werden. Dabei ist nicht festzustellen, ob das Gefäß bereits vorher mehrfach okkludiert war oder nur einmal und in welchem Umfang. Während der durchgeführten Koronarangiographie kann man nur einen aktuellen Zustand feststellen und keine Aussage über den vorherigen Verlauf treffen. Des Weiteren dauert ein Herzinfarkt im klinischen Modell meist länger als zwei Stunden, wohingegen in tierexperimentellen Studien Ischämiezeiten von maximal einer Stunde gewählt werden [155]. Der Vorgang ist auch hier im Menschen schlecht kontrollierbar und nachvollziehbar. So können zum zeitlichen Verlauf nur ungefähre Angaben gemacht werden.

Außerdem sind klinische Studien bezogen auf die Untersuchung von kardioprotektiven Therapeutika auch nur begrenzt. Es können bei präischämischer Applikationen nur Ischämien bei einem elektiven Eingriff wie zum Beispiel einer Bypassoperation beurteilt werden. Daher ist der Vergleich der Studien und die Übertragbarkeit eingeschränkt.

Es bleibt daher noch abzuwarten, wie ausgeprägt der kardioprotektive Effekt im Menschen wirklich ist. Selbst wenn man in Tiermodellen eine bemerkenswerte Reduktion der Infarktgröße und Verbesserung der Herzfunktion feststellen konnte, wird dieser Effekt in klinischen Studien wahrscheinlich geringer ausfallen. Auf der anderen Seite bedeutet eine Infarktreaktion in experimentellen Studien nicht, dass das Outcome in Patientenstudien wirklich besser ist und somit die Überlebensrate gesteigert oder die Herzfunktion verbessert wird [158].

4.1.2 Anti-inflammatorische Wirkung der HO-1 im Ischämie-Reperusionsmodell

Der Leukozyteninflux stellt eine der möglichen Ursachen für die Infarktreaktion dar. Vor allem im Infarktgebiet zeigte sich in unseren Untersuchungen im Myeloperoxidase-Assay ein anti-inflammatorischer Effekt in den hHO-1-überexprimierenden, transgenen und AAV-behandelten Gruppen. In diesen Gruppen war die Leukozyteninfiltration im

Infarktgebiet deutlich geringer als in der Kontrollgruppe. Auch in der AAR zeigte sich bei hHO-1-Überexpression ein Rückgang der Inflammation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser war allerdings nicht signifikant. Die Inhibition der hHO-1 durch ZnPP und die damit verbundene Aufhebung der positiven Effekte machten sich auch in der steigenden Inflammation im Infarktgebiet und AAR bemerkbar.

Unsere Ergebnisse korrespondieren mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Yeh et al. demonstrierten am Kaninchenmodell, dass der HO-1-Induktor Hämin nach myokardialer Reperfusion einen Rückgang der pro-inflammatorischen Zytokine bewirkte [159]. Im Rattenmodell zeigte sich die kardioprotektive Wirkung der HO-1 unter anderem in einer Verringerung der Infiltration inflammatorischer Zellen [137].

Melo et al. demonstrierten in ihrem Ischämie-Reperfusionsmodell an der Ratte die anti-inflammatorische Wirkung der HO-1 am Myokard [91]. Es zeigte sich vor allem eine Reduktion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 β .

Tang et al. stellten im Mausmodell im Myokard einen Rückgang der Infiltration inflammatorischer Zellen nach HO-1-Überexpression dar. CD45 positive Monozyten machten histologisch den größten Anteil dieser Zellen aus [136].

In unserer Studie wurden weder die Art der inflammatorischen Zellen, noch die Pathophysiologie untersucht. In der Literatur finden sich dazu aber einige Angaben. Die anti-inflammatorische Eigenschaft wird durch die Suppression der Neutrophilen-Infiltration vermittelt. Beeinflusst werden hierbei vor allem das „Rolling“, die Adhäsion und die Migration. Die Endothelaktivierung wird ebenfalls durch die HO-1 gesteuert, in Form einer reduzierten Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 [47, 48, 160, 161], dem monocyte-chemoattractant Protein [162] und dem Makrophagen stimulierenden Faktor [163, 164].

Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 wurde in vivo und in vitro durch die HO-1 erhöht [165, 166]. Andererseits präsentierten die Autoren Lee und Chau [167] diesbezüglich folgende Resultate: In vivo und in vitro zeigten sie, dass das Zytokin IL-10 seine anti-inflammatorische Wirkung durch die Induktion der HO-1-Expression entfaltet. Eine Regulation dieser Aktivierung durch das STAT-Protein wurde mehrfach angenommen [168]. Es scheint also ein sich gegenseitig beeinflussender Effekt vorzuliegen.

Die erhöhte Expression der HO-1 in Makrophagen führt zu einer Inhibition der Bildung freier Radikale. Pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6 und IL-8 werden weniger produziert [160]. Relativ neu ist die Annahme, dass die HO-1 den Makrophagen-

migrationsinhibierenden Faktor MIF negativ reguliert. Der MIF ist ein Zytokin, welches nach Freisetzung die Produktion pro-inflammatorischer Faktoren in Makrophagen induziert. Außerdem soll es einen modulierenden Effekt auf den Toll-like-Rezeptor TLR-4 haben [169].

In neueren Studien wird immer wieder eine anti-inflammatorische Wirkung der HO-1 durch Suppression des TLR-4 in Erwägung gezogen [168, 170]. TLR-4 aktiviert eine Signalkaskade, welche eine Reihe von pro-inflammatorischen Prozessen in Bewegung setzt. Bislang wurde dieser Aspekt allerdings hauptsächlich im Sepsismodell untersucht, wo als Initiator LPS (Lipopolysaccharid) eine Rolle spielt [169]. Der gleicher Einfluss im Ischämie-Reperusionsmodell wurde in einigen Studien bereits untersucht, zum Beispiel an der Leber [171, 172].

Man geht davon aus, dass nicht nur die hHO-1 selbst eine anti-inflammatorische Wirkung hat. Vor allem ihre Reaktionsprodukte CO und Bilirubin stehen immer wieder im Mittelpunkt verschiedenster Untersuchungen.

Die anti-inflammatorische Wirkung des CO scheint durch die Herunterregulierung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-6, IL-1 β und dem Makrophagen-inflammatorischen Protein MIP-1 α [173] sowie der Steigerung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 [174] vermittelt zu sein. Die Regulation der Zytokine soll vor allem über die Phosphorylierung der MAP-Kinase 3/ p38 erfolgen [173] [56, 173]. In humanen Muskelzellen der Atemwege zeigte sich in vitro, dass CO über die Phosphorylierung der ERK 1/2 MAPK die IL-1 β -induzierte GM-CSF-Synthese hemmt [175].

Der Einfluss auf die Adhäsionsmoleküle wurde unterschiedlich gewertet. In vitro zeigte sich in einer Studie kein signifikanter Einfluss des CO auf ICAM-1 und VCAM-1 [176]. Im Mausmodell konnte ein Einfluss auf die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 demonstriert werden [177].

Nakahira et al. präsentierten CO in vitro und in vivo als den entscheidenden Regulator der TLR Signalkaskade [178].

Im Sepsismodell wurde demonstriert, dass CO zu einer verminderten Phosphorylierung der Proteinkinasen JNK und damit zu einer verminderten Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 führt. Dies hat eine verminderte Zytokin-Freisetzung zur Folge [165]. Ähnliche Signalwege könnten auch in unserem Modell von Bedeutung sein.

In einigen Studien wurde auch die anti-inflammatorische Wirkung des Bilirubins untersucht, im Vordergrund standen vor allem die Einflussnahme auf die Adhäsionsmoleküle [179, 180] und die Reduktion der pro-inflammatorischen Zytokine [181]. Allerdings wurden die meisten Studien bezüglich der anti-inflammatorischen Wirkung des Bilirubins in der Leber [182] durchgeführt. Obwohl auch einige Studien in anderen Organen einen protektiven Effekt des Bilirubins zeigten [76, 183], bleibt Bilirubin als therapeutische Option weiterhin fraglich, da sie mit der Gefahr einer Hyperbilirubinämie mit verheerenden Folgen wie einem Kernikterus einhergeht [66, 77].

4.1.3 Anti-apoptotische Wirkung der HO-1 im Ischämie-Reperusionsmodell

Die Apoptose wird ebenfalls von der HO-1 positiv beeinflusst. So zeigte sich eine deutliche Reduktion apoptotischer Zellen in der AAR bei transgenen und AAV-behandelten Tieren. Der verringerte Zelluntergang der Kardiomyozyten senkt die Infarktgröße ebenfalls und beeinflusst dementsprechend auch die Herzfunktion. Neben dem Einfluss der HO-1 auf die Kardiomyozyten und deren Funktion ist der Einfluss auf die Endothelzellen von Interesse. Hierzu haben wir die Kapillardichte der AAR betrachtet. Es zeigte sich unter hHO-1-Einfluss eine signifikant höhere Kapillardichte. Da in so kurzer Zeit eine Entstehung neuer Kapillaren als unwahrscheinlich anzunehmen ist, lässt sich daraus schließen, dass nicht nur Kardiomyozyten vermehrt überleben, sondern ebenfalls Endothelzellen geschützt werden.

In unseren in-vitro-Versuchen zeigte sich, dass die mit hHO-1 transfizierten humanen Endothelzellen ein erhöhtes Zellüberleben aufweisen, was für einen direkten schützenden Effekt der hHO-1 auf die Endothelzellen spricht.

Nach Zugabe von einem Medium von Kardiomyozyten mit oder ohne Transfektion von hHO-1 zu den Endothelzellen zeigte sich nach Hypoxie und Reperfusion ein erhöhtes Überleben der Endothelzellen mit dem Medium von hHO-1-überexprimierenden Kardiomyozyten. Die Endothelzellen werden vermutlich auch indirekt über ausgeschüttete Faktoren der hHO-1 geschützt.

In unseren in-vitro-Versuchen konnten wir auch zeigen, dass Myozyten direkt geschützt werden und somit die Apoptoserate sinkt.

Wir gehen davon aus, dass sowohl Kardiomyozyten als auch Endothelzellen durch die hHO-1 vor dem Zelltod geschützt werden und beides zur Kardioprotektion beiträgt. Der Schutz der Endothelzellen geht vermutlich mit einer verbesserten Perfusion und Regeneration des umliegenden Gewebes einher.

Unsere Ergebnisse stehen mit denen vieler Arbeitsgruppen im Einklang, die eine anti-apoptotische Wirkung der HO-1 feststellten und diese gleichzeitig als eine der Hauptursachen für die Zytoprotektion am Herzen ansahen. Vulapalli et al. wiesen eine Kardioprotektion der Ratten-HO-1 nach. Im Ischämie-Reperusionsmodell am Mäuseherz stellten sie in vitro und in vivo bei kardialer HO-1-Überexpression einen Rückgang der Apoptose dar [184].

Die AAV vermittelte Überexpression der HO-1 führte im kardialen Ischämie-Reperusionsmodell zu einem verminderten Zelluntergang. Die Herzfunktion konnte so verbessert werden [137].

In der Literatur wird die anti-apoptotische Wirkung der HO-1 sowohl mit Hinblick auf die Kardiomyozyten [185, 186], als auch auf die Endothelzellen beschrieben [187, 188]. Auch wir haben in unserer Studie gezeigt, dass beide unterschiedlichen Zellarten vor der Apoptose geschützt werden. Die HO-1 hemmt Zytokine wie zum Beispiel $\text{TNF-}\alpha$ oder $\text{IFN-}\gamma$, welche den programmierten Zelltod über den Fas-Rezeptor initiieren [65, 189, 190].

Für die Regulation der Apoptose durch die HO-1 wird die MAPK-Familie häufig als verantwortlich erklärt [190, 191]. Immer wieder wurde in diesem Zusammenhang die Aktivierung der p38-MAPK untersucht [192]. In Endothelzellen führt eine Aktivierung der p38-MAPK zum Rückgang der Apoptose [190]. Auch CO soll über den MAPK-Signalweg an diesem Weg beteiligt sein [43, 191]. Am Herzen wurde die anti-apoptotische Wirkung durch Hemmung der MAPK in Erwägung gezogen [193]. Akamatsu et al. [188] geben für diesen scheinbaren Widerspruch eine Erklärung: Die Unterform der MAPK $\text{p38}\alpha$ wirkt pro-apoptotisch und wird wohl herunterreguliert, wohingegen die $\text{p38}\beta$ anti-apoptotisch wirkt und ihren positiven Effekt durch Aktivierung ausübt. So spielen die verschiedenen Unterformen in unterschiedlichen Zelltypen eine Rolle [191, 194].

Die HO-1 moduliert die Expression pro- und anti-apoptotischer Proteine. Das anti-apoptotische Protein bcl-2 wird durch die HO-1 in seiner Expression gesteigert [91, 195]. Andersherum wird die Expression pro-apoptotischer Proteine wie bax vermindert [91]. Tang et al. zeigten einen Rückgang apoptotischer Kardiomyozyten und damit

verbunden eine Reduktion der apoptotischen Proteine bax und bak [136]. Auch das Tumorsuppressorgen p53, welches durch die HO-1 suppremiert wird, ist bei der Regulation entscheidend beteiligt [185, 196].

Wang et al. beschreiben eine direkte Bindung der HO-1 mit bax an der Mitochondrienmembran. Dies soll wohl die Oligomerisation von bax verhindern und dementsprechend die Fähigkeit, die Membran zu destabilisieren und die Cytochrom c-Freisetzung zu initiieren, reduzieren [197].

CO leistet einen relevanten Beitrag zu der anti-apoptotischen Wirkung der HO-1. Neben dem MAPK-Signalweg [190] wurde auch die Aktivierung des NF- κ B, welcher als Transkriptionsfaktor die Expression von anti-apoptotischen Proteinen wie bcl-2 oder cIAP-2 (cellular Inhibitor of apoptosis-2) steigert, als verantwortlich erklärt [187, 198]. Die Caspase-3-Aktivität als Zeichen des Apoptoseablaufs wird durch CO reduziert [192]. Über die PI3K/p38-MAPK werden STAT1 und STAT3-Proteine durch Phosphorylierung aktiviert. Sie regulieren die Transkription von Genen, die in den Ablauf der Apoptose involviert sind. So reduzieren sie zum Beispiel die Expression des Todesliganden Fas und die Caspase-3-Aktivität und somit die Apoptoserate. Dieser Effekt wird ebenfalls durch CO vermittelt [144, 199].

CO soll außerdem über die Änderung der Permeabilität der Mitochondrienmembran den Zelltod verhindern. Die Steigerung der Membranstabilität verhindert, dass pro-apoptotisch wirkende Proteine ins Zytosol freigesetzt werden und die Apoptose der Zelle eingeleitet wird [185, 200, 201].

Auch die Änderung des Elektronenflusses durch die Mitochondrienmembran scheint durch CO beeinflusst zu werden. Dabei ermöglicht CO die Akkumulation der Elektronen im Komplex III. Dadurch wird die Produktion von Superoxiden und Wasserstoffperoxid gesteigert und dies aktiviert wiederum die MAPK wie oben beschrieben [64].

Interessant ist, dass CO als kleines, gasförmiges Signalmolekül Zellgrenzen überschreiten, interzellulär wirken und somit auch benachbarte Zellen wie Leukozyten, Kardiomyozyten und andere Endothelzellen schützen kann [190]. Dies kann durchaus auch eine Erklärung für den indirekten Schutz der Endothelzellen in unserem in-vitro-Versuch darstellen.

In einem Ischämie-Reperfusionsmodell der Leber konnten Bilirubin/Biliverdin die Einleitung der Apoptose [43] verhindern oder wenigstens reduzieren. In vitro demonstrierten Pachori et al. [202] den Rückgang der Apoptose in Kardiomyozyten bei HO-1-Überexpression. Es zeigte sich vor allem ein Zusammenhang mit der Aktivierung

des PI3K-AKT(Phosphoinositid-3-Kinase-Proteinkinase B)-Signalwegs, der durch seine Phosphorylierung wichtiger Proteine eine Reduktion der Apoptose bewirkte. Die Biliverdin-Reduktase, die ein wichtiges Enzym im Stoffwechsel des Häms darstellt, wurde auf ihre Wirkung auf die AKT hin untersucht und es ließ sich ein Einfluss nachweisen [202, 203].

Welche Rolle die Zwischenprodukte der HO-1 wirklich spielen, bleibt immer noch unklar, da es diesbezüglich sehr viele verschiedene Meinungen gibt. Einige Gruppen konnten in ihren Versuchen keinen Einfluss der CO auf die Apoptose nachweisen [204]. Andere sehen im Bilirubin nur eine untergeordnete Rolle. Liu et al zeigten sogar, dass Bilirubin in vitro in Gefäßmuskelzellen die Apoptoserate steigert. Dieser Effekt wurde allerdings nur in dieser Zellreihe untersucht, es könnte womöglich ein zellabhängiger Einfluss auf die Apoptose bestehen [205].

Es gibt auch einige Arbeitsgruppen, welche eine anti-apoptotische Wirkung des Eisens zeigten [190]. Man muss aber sagen, dass es weitaus mehr Untersuchungen zum CO und Bilirubin gibt und die Wirkung des Eisens nach heutigem Wissenstand nicht der Hauptwirkmechanismus der HO-1-vermittelten anti-apoptotischen Wirkung sein kann [206].

4.2 Methodendiskussion

4.2.1 Transgenes Schweinemodell

Die meisten Studien zu der kardioprotektiven Funktion der HO-1 im Ischämie-Reperusionsmodell sind an der Ratte oder an der Maus durchgeführt worden.

Das Ratten- beziehungsweise Mausmodell unterscheidet sich allerdings stark von dem menschlichen Organismus. Allein in Bezug auf das Herz differiert die Physiologie stark: Das Mäuseherz schlägt 600 bpm und der Auswurf beträgt 20 ml/ min, wohingegen das menschliche Herz 60 bpm mit einem Auswurf von 5 l/ min leistet [112].

Das Schweinemodell entspricht im Gegensatz zu den Kleintiermodellen eher den menschlichen Bedingungen [113, 114]. Allein schon die Größe, aber auch die Anatomie des Herzens und der Koronargefäße ähnelt sehr denen des Menschen [115].

Eine weitere wichtige Anforderung an ein geeignetes Tiermodell ist die Vergleichbarkeit der räumlichen Ausbreitung des Infarktes mit der des menschlichen Herzens. Der Infarkt breitet sich in Schweinen, Hunden und anderen Großtieren vor allem subendokardial aus. Dies entspricht der Ausbreitung des menschlichen Herzinfarktes, denn auch hier sind die subendokardial gelegenen Myozyten am schlechtesten mit Sauerstoff versorgt. In Mäusen sind die inneren Endokardschichten durch Diffusion gut mit Sauerstoff versorgt. Es sind vor allem die äußeren Myokardschichten vom Infarkt betroffen [115].

Der Kollateralkreislauf am Herzen ist im Schwein im Gegensatz zu anderen Großtieren wie zum Beispiel dem Hund eher spärlich ausgeprägt [116]. Dies entspricht der Blutversorgung des menschlichen Herzens. Die Größe des Infarktes des Schweins kommt der Infarktgröße im Menschenherz daher sehr nahe [117]. Einige Autoren sind der Meinung, dass das Schweinmodell sehr gut dem jungen Menschen entspricht, wohingegen ältere Menschen mit abgelaufenen Minderperfusionen ein größeres Kollateralsystem entwickeln und dies eher durch das Hundemodell abgebildet werden kann [115].

Nicht nur die Anatomie und die Physiologie des Schweins sind denen des Menschen ähnlich. Das Schweinegenom, welches mittlerweile bestens entschlüsselt ist, ist dem menschlichem Genom viel näher als das der Maus [118]. Dies ist für die Übertragbarkeit auf den Menschen von äußerster Bedeutung.

Die Nutzung transgener Tiere zur Erforschung biomedizinischer Prozesse und Erkrankungen ist seit längerer Zeit Standard. Der Vorteil im Gegensatz zu anderen gentherapeutischen Interventionen liegt in der kontinuierlichen und vollständigen Veränderung im gesamten Genom des Organismus'. Die Entwicklung transgener Schweine ist immer weiter fortgeschritten. Die ersten mit somatischen Zellkerntransfer produzierten Schweine wurden im Jahr 2000 hergestellt [104, 119]. Dabei war vor allem die Effizienz der Befruchtung mit unter 1% eher dürftig, wobei es sich bei allen Nachkommen immer um transgene Tiere handelte. Mit neueren Methoden konnte die Effizienz gesteigert werden [104].

Wir haben uns daher für das transgene Schweinmodell entschieden. Es gab bislang kaum Studien, welche die Funktion der hHO-1 im Ischämie-Reperfusionmodell in einem präklinischen Schweinmodell zum Inhalt hatten. Dies verleiht unseren Untersuchungen eine Besonderheit.

Nachteilig an diesem Modell sind die relativ kleine Tierzahl, das komplizierte Tiermodell und die teuren Kosten [120]. Zu den Kosten der aufwendigen transgenen Herstellung kommt der erhöhte Bedarf an pharmakologischen Mitteln [115]. Nicht zu vernachlässigen ist auch die Notwendigkeit geeigneter Räumlichkeiten. Dank guter Kooperationspartner waren uns diese Aspekte kein Hindernis. Ein wenig zu beeinflussender Faktor war die nach wie vor bestehende Gefahr, dass aus einem konstruierten Embryo kein Nachkomme entsteht. Dies führt unter Umständen zu Verzögerungen im Studienablauf.

Als weiteren Kritikpunkt lässt sich noch hinzufügen, dass es sich bei unseren Versuchstieren um junge und gesunde Tiere gehandelt hat [117]. In der Realität handelt es sich bei Patienten mit Myokardinfarkt häufig um ältere und multimorbide Patienten, bei denen die Therapieoptionen von vornherein eingeschränkt sind beziehungsweise schlechter greifen. Dies trifft aber auch auf die Kleintiermodelle anderer Arbeitsgruppen zu. Es ist also durchaus sinnvoll, Modelle mit Komorbiditäten zu etablieren, um eine bessere Übertragbarkeit auf Patienten sicherzustellen. So wurde eine Studie mit fettreicher Diät durchgeführt, die den Effekt der HO-1 steigerten [121]. Eine fettreiche Fütterung der Tiere, die eine Dislipidämie widerspiegeln soll, wird auch von anderen Arbeitsgruppen [122] angewendet, um einen Effekt bei Risikopatienten mit Cholesterinämie zu untersuchen. Liu et al. [123] zeigten in einem myokardialen Ischämie-Reperusionsmodell bei Mäusen, dass sich eine HO-1-Überexpression auch bei diabetischen Mäusen positiv auswirkt. Die diabetische Stoffwechsellage wurde durch Streptozotocin, ein toxisch für die insulinproduzierenden Betazellen des Pankreas wirkendes Chemotherapeutikum, induziert. 28 Tage später wurden Versuche mit HO-1-transgenen Mäusen sowie Kontrollmäusen mit und ohne diabetische Stoffwechsellage durchgeführt. Sowohl bei diabetischen Mäusen, als auch bei Kontrollmäusen zeigte die HO-1 einen kardioprotektiven Effekt. Diabetes steigert den oxidativen Stress und führt auf lange Sicht zu vielerlei Komplikationen. Unklar bleibt in dieser Studie, ob ein vergleichbarer Effekt bei Langzeitdiabetikern mit bereits bestehenden kardiovaskulären Komplikationen zu erwarten ist.

Abschließend kann man sagen, dass die Vorteile eines präklinischen Großtiermodells überwiegen und vor allem das Schwein hierfür sehr geeignet ist. Dennoch ist es sinnvoll, als Vorläuferstudien Kleintiermodelle zu nutzen. Man kann hier leichter eine hohe Gruppengröße erreichen. Diese Modelle sollen eine Art Screening darstellen und sind notwendig, um präklinische Studien und letztlich klinische Studien zu etablieren [124].

4.3 Klinische Bedeutung

Die hHO-1 hat sich im Ischämie-Reperfusionsmodell als kardioprotektiv erwiesen.

Die AAV-Applikation als gentherapeutische Strategie ist Bestandteil vieler klinischer Studien, vor allem mit Hinblick auf Therapieoptionen bei zystischer Fibrose [207] und Hämophilie [208]. Die Studien befinden sich in Phase 1 und 2. Nicht nur mögliche Nebenwirkungen wie Tumorgenese [209], inflammatorische Reaktionen und neutralisierende Antikörper gegen AAV [210] werden diskutiert, es bestehen auch noch gewisse Zweifel am therapeutischen Effekt anderer Studien, z.B. im Rahmen der Mukoviszidose [211].

Im Herzen wurde der Gentransfer mit AAV tierexperimentell [91, 130] sowie in klinischen Studien [212] bereits erfolgreich durchgeführt [213].

Der zwei- bis dreiwöchige Zeitraum zwischen Transfektion des AAV bis zur Expression des Proteins ist in unserer Studie der entscheidende Nachteil. So wird sich der AAV nicht als der entscheidende therapeutische Ansatz im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes durchsetzen. Der Nachteil ist, dass der Myokardinfarkt als Ereignis eben nicht vorhersehbar ist und die entsprechende Therapie erst danach eingeleitet werden kann [158]. Viele Studien im Rahmen des Myokardinfarktes, so auch unsere, haben ihre Kardioprotektion aber durch eine präischämische Therapie erzielt.

Denkbar wäre natürlich der Einsatz im Rahmen eines geplanten Eingriffes wie zum Beispiel einer Bypass-Operation, um möglichen Ischämien vorab protektiv entgegen zu wirken. Eine dauerhafte Therapie bei Risikopatienten ist aber auch wegen einer Langzeitexpression und damit verbundenen Schäden wie zum Beispiel der Tumorgenese noch nicht denkbar [66].

Andere Möglichkeiten, die Expression der hHO-1 im Menschen zu steigern, wären zum Beispiel die Verwendung von Induktoren der hHO-1 wie etwa Hämin oder CoPP.

Hämin wurde bereits in klinischen Studien verwendet und steigerte die hHO-1-Expression in den ersten 48 Stunden [214, 215] ohne bisherige gravierende Nebenwirkungen.

In vitro steigerte CoPP die HO-1-Expression über Bach1 und Nrf2 [216, 217]. Abraham et al. zeigten auch in vivo einen positiven Effekt auf die HO-1-Expression [218]. Da eine Toxizität des CoPP Sorgen bereitet [219], haben andere Arbeitsgruppen nach

bereits etablierten Pharmakotherapeutika gesucht, welche die hHO-1-Expression steigern [66]. Lee et al. [220] zeigten eine Erhöhung der HO-1-Expression via p38 und AKT durch die Gabe von Statinen. Auch Ali et al. [221] demonstrierten, dass Simvastatin und Atorvastatin die HO-1-Expression in Endothelzellen steigern. Es gibt aber auch Untersuchungen, welche den Einfluss der Statine auf die Expressionsrate der HO-1 in Frage stellen [222].

Relativ neu ist die Verwendung von MicroRNA (miRNA). MiRNA kodieren keine Proteine, sie inhibieren ihr target post-transkriptionell über eine Basenpaarung an der 3'UTR(Untranslated Region)-Region der target-mRNA (messenger RNA) [223]. Neuere Studienergebnisse ergaben, dass miRNA die HO-1-Expression indirekt steigern könnte. Die miRNA-155 inhibiert beispielsweise das Repressorprotein der HMOX-1 Bach1 und verstärkt somit die HO-1-Expression [224, 225]. Als therapeutische Applikation werden verschiedene Optionen erprobt. Eine Möglichkeit stellt die Applikation via neutraler Fettemulsion [226] dar. Einige Studien nutzen den Transfer mittels Nanopartikel für die Expression von anderen kleinmolekulären RNA, den siRNA. Dieser Transfer bietet den Vorteil der Stabilität und das Ausbleiben einer Langzeitexpression [227].

Wie bereits beschrieben, haben die Beiprodukte CO und Bilirubin ebenfalls einen zytoprotektiven Effekt im Ischämie-Reperfusionsmodell und wurden in vielen Studien untersucht. Einige Arbeitsgruppen verwendeten im tierexperimentellen Modell zum Beispiel das wasserlösliche CO freisetzende Molekül CORM-3 als Infusion, um CO zu applizieren. Sie sahen hierin eine zuverlässige und sichere Methode, einen positiven Einfluss auf die Therapie des Myokardinfarktes zu nehmen [73, 144, 228]. Klinische Studien sollten hierfür allerdings intensiviert werden.

Die HO-1 scheint ein mögliches Therapeutikum für den Myokardinfarkt darzustellen. Die Translation in ein klinisches Modell steht allerdings noch aus. Es gäbe jedoch wie oben aufgeführt einige verschiedene denkbare Optionen, die natürlich vertiefend untersucht werden müssen.

Da die Meinung vertreten wird, dass die HO-1 durch ihre anti-apoptotische und pro-angiogenetische Wirkung neben der Kardioprotektion auch eine Karzinogenese fördern könnte [229], sollte dieser Aspekt in die präklinischen Untersuchungen mit einbezogen werden.

Dieses Risiko könnte bei einer regionalen Transfektion, eventuell kombiniert mit einem kardiospezifischem Promotor und steuerbarer Expressionsdauer, auf ein vertretbares Maß reduziert werden.

Dann wäre nach unseren Daten in No-Option-Patienten mit sehr hohem Risiko und repetitiven Ischämien ein funktionabler Nutzen der hHO-1-Überexpression zu erwarten und möglicherweise eine Gentherapie in diesem Patientenkollektiv realisierbar.

5. Zusammenfassung

Wir haben gezeigt, dass eine hHO-1-Überexpression in Schweinen die Infarktgröße reduziert und die postischämische Herzfunktion sowohl global als auch regional verbessert. Als Ursache für diese kardioprotektive Wirkung wurden der Rückgang der postischämischen Inflammation und der Apoptoserate unter hHO-1-Überexpression gezeigt. Wir stellten vermehrtes Zellüberleben von Kardiomyozyten und Endothelzellen fest, die wohl beide für einen Rückgang des Reperfusionsschadens verantwortlich sein könnten.

Wir haben zusammenfassend also eine kardioprotektive Wirkung der hHO-1 im Ischämie-Reperusionsmodell am Schwein festgestellt. Dieser Erfolg im präklinischen Schweinemodell deutet auf ein hohes therapeutisches Potential hin. Wir erzielten unter Verwendung eines hHO-1 enthaltenden AAV eine Kardioprotektion. Wegen des benötigten Zeitraums zwischen Transfektion und Expressionslevel wird sich dieser allerdings nicht als entscheidende Therapieoption im akuten Myokardinfarkt durchsetzen. Um als erfolgversprechende Behandlungsalternative im akuten Myokardinfarkt am Menschen eingesetzt werden zu können, bedarf es weiterer Studien, die Alternativen zur zeitnahen Steigerung der hHO-1-Expression untersuchen.

6. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

A	Adenin
AAR	<i>Area at risk</i>
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
AIV	anteriore interventrikuläre Vene
AKT	Proteinkinase B
AMV	<i>Avian Myeloblastosis virus</i>
Anova	<i>Analysis of variance</i>
AP	alkalische Phosphatase
AP-1	<i>Activating Protein-1</i>
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor-1</i>
APC	Allophycocyanin
Apo-1	<i>Apoptosis antigen-1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BamHI	Bacillus amyloliquefaciens H
BCA	Bicinchoninsäure
Bp	Basenpaare
bpm	Schläge pro Minute
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
Caspase	<i>Cystein-dependent aspartate-specific Proteases</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>copy</i> -Desoxyribonukleinsäure
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
cIAP	<i>cellular Inhibitor of Apoptosis</i>
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoPP	Cobalt Protoporphyrin
CORM	<i>Carbon monoxide-releasing molecule</i>
CsCl ₂	Caesiumchlorid
C _t	<i>Cycle Threshold</i>
Cu	Kupfer

DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
ddH ₂ O	Aqua bidestillata
dest.	destilliertes
Diablo	<i>Direct IAP binding protein with low pI</i>
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbeccco's Modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ecG	<i>Equine chorionic Gonadotropin</i>
ECL	<i>Enhanced Chemical Luminescence</i>
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ERK 1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
ESL-1	E-Selektin-Ligand-1
et al.	et alii
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen stimulierender Faktor
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
hcG	Humanes Choriongonadotropin
HCl	Chlorwasserstoff
HEK 293	<i>Human Embryonic kidney-293</i>
HES	Hydroxyethylstärke
HF	Herzfrequenz
hHO-1	humane Hämoxygenase-1
HMEC	<i>Human mammary epithelial cells</i>
HMOX-1	HO-1 Gen
HO	Hämoxygenase
HOCL	Hypochlorige Säure
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>

HSP-32	Hitzeschockprotein-32
HTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis</i>
ICAM-1/ 2	<i>Intercellulare adhesion molecule-1/ 2</i>
I.E.	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITR	<i>inverted terminal repeats</i>
i.v.	intravenös
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
kB	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
Keap 1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
KG	Körpergewicht
LacZ	Gen kodierend für β -Galactosidase
LAD	<i>Left anterior descending artery</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LFA-1	<i>Leukocyte function associated antigen-1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LTB ₄	Leukotrien B ₄
LVEDP	Linksventrikuläre enddiastolischer Druck
LVP	Linksventrikulärer Druck
MAC-1	<i>Macrophage-1 antigen</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
M-CSF	Makrophagen stimulierender Faktor
MCP-1	<i>Monocyte-chemotactic-protein-1</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MIF	Makrophagen migrationinhibierender Faktor
min	Minute(n)
MIP-1	<i>Macrophage inflammatory protein-1</i>
miRNA	Micro RNA
MMP	Matrix-Metalloprotease
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	<i>Messenger RNA</i>

MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCSU-23	<i>North Carolina state university Medium-23</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NO	Stickstoffmonoxid
Nrf2	<i>NF-E2-related factor 2</i>
ORI	offenes Leseraster
PAF	<i>Platelet Activating Factor</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PECAM	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
PEI	Polyethylenimine
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PKC	Proteinkinase C
PRR	<i>Pattern recognition-Rezeptor</i>
PSGL-1	P-Selektin-Ligand-1
PTCA	Perkutane transluminale koronare Angioplastie
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative PCR
RCX	Ramus circumflexus
Rep	Replikationsproteine
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SCNT	somatischer Zellkerntransfer
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardabweichung
SES	Subendokardiale Segmentverkürzung
Smac	<i>Second mitochondria-derived activator of caspases</i>
SnPP	Zinkprotoporphyrin
SOC	<i>Super optimal broth with catabolite repression</i>
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum

SRP	synchronisierte Retroperfusion
SSR	<i>Selective pressure-regulated retroinfusion</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
StREs	<i>Stress-responsive Elements</i>
t	Zeit
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-buffered-saline
TdT	Terminale Desoxynucleotidyl Transferase
TG	Transgen
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TMED	Tetramethylethylendiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNFR-1	Tumornekrosefaktor Rezeptor-1
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
UTR	<i>Untranslated Region</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vgl.	vergleiche
vs.	versus
XbaI	Xanthomonas badrii
ZnPP	Zinkprotoporphyrin

7. Literaturverzeichnis

1. Hazinski, M.F., et al., Part 1: Executive summary: 2010 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science With Treatment Recommendations. *Circulation*, 2010. 122(16 Suppl 2): p. S250-75.
2. Emberson, J., et al., Evaluating the impact of population and high-risk strategies for the primary prevention of cardiovascular disease. *Eur Heart J*, 2004. 25(6): p. 484-91.
3. Matsumura, K., et al., Progression of myocardial necrosis during reperfusion of ischemic myocardium. *Circulation*, 1998. 97(8): p. 795-804.
4. Piper, H.M., D. Garcia-Dorado, and M. Ovize, A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 1998. 38(2): p. 291-300.
5. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*, 2007. 357(11): p. 1121-35.
6. Braunwald, E. and R.A. Kloner, The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*, 1982. 66(6): p. 1146-9.
7. Bolli, R. and E. Marban, Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev*, 1999. 79(2): p. 609-34.
8. Kloner, R.A., C.E. Ganote, and R.B. Jennings, The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest*, 1974. 54(6): p. 1496-508.
9. Krug, A., R. Du Mesnil de, and G. Korb, Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion. *Circ Res*, 1966. 19(1): p. 57-62.
10. Ito, H., No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2006. 3(9): p. 499-506.
11. Ferdinandy, P., R. Schulz, and G.F. Baxter, Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev*, 2007. 59(4): p. 418-58.
12. Turer, A.T. and J.A. Hill, Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy. *Am J Cardiol*, 2010. 106(3): p. 360-8.
13. Zweier, J.L. and M.A. Talukder, The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 2006. 70(2): p. 181-90.

14. Murphy, E. and C. Steenbergen, Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev*, 2008. 88(2): p. 581-609.
15. Siegmund, B., K.D. Schluter, and H.M. Piper, Calcium and the oxygen paradox. *Cardiovasc Res*, 1993. 27(10): p. 1778-83.
16. Nian, M., et al., Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res*, 2004. 94(12): p. 1543-53.
17. Deten, A., et al., Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. *Cardiovasc Res*, 2002. 55(2): p. 329-40.
18. Vinten-Johansen, J., Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 2004. 61(3): p. 481-97.
19. Ley, K. and P. Gaehtgens, Endothelial, not hemodynamic, differences are responsible for preferential leukocyte rolling in rat mesenteric venules. *Circ Res*, 1991. 69(4): p. 1034-41.
20. Frangogiannis, N.G., C.W. Smith, and M.L. Entman, The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 2002. 53(1): p. 31-47.
21. Hahne, M., et al., Five tumor necrosis factor-inducible cell adhesion mechanisms on the surface of mouse endothelioma cells mediate the binding of leukocytes. *J Cell Biol*, 1993. 121(3): p. 655-64.
22. Bevilacqua, M.P. and R.M. Nelson, Selectins. *J Clin Invest*, 1993. 91(2): p. 379-87.
23. Steegmaier, M., et al., The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature*, 1995. 373(6515): p. 615-20.
24. Hansen, P.R., Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*, 1995. 91(6): p. 1872-85.
25. Luscinskas, F.W. and J. Lawler, Integrins as dynamic regulators of vascular function. *FASEB J*, 1994. 8(12): p. 929-38.
26. Arnaout, M.A., Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood*, 1990. 75(5): p. 1037-50.
27. Jordan, J.E., Z.Q. Zhao, and J. Vinten-Johansen, The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 1999. 43(4): p. 860-78.

28. Albelda, S.M., C.W. Smith, and P.A. Ward, Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J*, 1994. 8(8): p. 504-12.
29. Ikeda, U., et al., Neutrophil adherence to rat cardiac myocyte by proinflammatory cytokines. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1994. 23(4): p. 647-52.
30. Kupatt, C., et al., Tumor necrosis factor- α contributes to ischemia- and reperfusion-induced endothelial activation in isolated hearts. *Circ Res*, 1999. 84(4): p. 392-400.
31. Fan, H., et al., Oxygen radicals trigger activation of NF- κ B and AP-1 and upregulation of ICAM-1 in reperfused canine heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. 282(5): p. H1778-86.
32. Frangogiannis, N.G. and M.L. Entman, Chemokines in myocardial ischemia. *Trends Cardiovasc Med*, 2005. 15(5): p. 163-9.
33. Vaporciyan, A.A., et al., Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science*, 1993. 262(5139): p. 1580-2.
34. Muller, W.A., et al., PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med*, 1993. 178(2): p. 449-60.
35. Nourshargh, S., F. Krombach, and E. Dejana, The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *J Leukoc Biol*, 2006. 80(4): p. 714-8.
36. Gwechenberger, M., et al., Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation*, 1999. 99(4): p. 546-51.
37. Kukielka, G.L., et al., Induction of interleukin-6 synthesis in the myocardium. Potential role in postreperfusion inflammatory injury. *Circulation*, 1995. 92(7): p. 1866-75.
38. Duilio, C., et al., Neutrophils are primary source of O₂ radicals during reperfusion after prolonged myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. 280(6): p. H2649-57.
39. Romson, J.L., et al., Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation*, 1983. 67(5): p. 1016-23.
40. Chen, Z., et al., Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. 280(5): p. H2313-20.

41. Gottlieb, R.A., et al., Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest*, 1994. 94(4): p. 1621-8.
42. Fliss, H. and D. Gatterer, Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res*, 1996. 79(5): p. 949-56.
43. Morse, D., et al., Heme Oxygenase-1, a Critical Arbitrator of Cell Death Pathways in Lung Injury and Disease. *Free Radic Biol Med*, 2009. 47(1): p. 1-12.
44. Feltham, R., N. Khan, and J. Silke, IAPS and ubiquitylation. *IUBMB Life*, 2012. 64(5): p. 411-8.
45. Tenhunen, R., H.S. Marver, and R. Schmid, The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1968. 61(2): p. 748-55.
46. Abraham, N.G., et al., Expression of heme oxygenase in hemopoiesis. *Adv Exp Med Biol*, 1988. 241: p. 97-116.
47. Wagener, F.A., et al., Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev*, 2003. 55(3): p. 551-71.
48. Kushida, T., et al., TNF-alpha-mediated cell death is attenuated by retrovirus delivery of human heme oxygenase-1 gene into human microvessel endothelial cells. *Transplant Proc*, 2002. 34(7): p. 2973-8.
49. McCoubrey, W.K., Jr., J.F. Ewing, and M.D. Maines, Human heme oxygenase-2: characterization and expression of a full-length cDNA and evidence suggesting that the two HO-2 transcripts may differ by choice of polyadenylation signal. *Arch Biochem Biophys*, 1992. 295(1): p. 13-20.
50. Keyse, S.M. and R.M. Tyrrell, Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. 86(1): p. 99-103.
51. Koizumi, T., M. Negishi, and A. Ichikawa, Induction of heme oxygenase by delta 12-prostaglandin J2 in porcine aortic endothelial cells. *Prostaglandins*, 1992. 43(2): p. 121-31.
52. Immenschuh, S. and G. Ramadori, Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. *Biochem Pharmacol*, 2000. 60(8): p. 1121-8.

53. Maines, M.D., G.M. Trakshel, and R.K. Kutty, Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem*, 1986. 261(1): p. 411-9.
54. Yet, S.F., et al., Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice. *J Clin Invest*, 1999. 103(8): p. R23-9.
55. Shibahara, S., R.M. Muller, and H. Taguchi, Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *J Biol Chem*, 1987. 262(27): p. 12889-92.
56. Morse, D. and A.M. Choi, Heme oxygenase-1: from bench to bedside. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005. 172(6): p. 660-70.
57. Kim, H.P., et al., Heme oxygenase-1 comes back to endoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. 404(1): p. 1-5.
58. Lin, Q., et al., Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *J Biol Chem*, 2007. 282(28): p. 20621-33.
59. Kim, H.P., et al., Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *FASEB J*, 2004. 18(10): p. 1080-9.
60. Dulak, J., A. Loboda, and A. Jozkowicz, Effect of heme oxygenase-1 on vascular function and disease. *Curr Opin Lipidol*, 2008. 19(5): p. 505-12.
61. Lavrovsky, Y., et al., Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(13): p. 5987-91.
62. Kinobe, R.T., R.A. Dercho, and K. Nakatsu, Inhibitors of the heme oxygenase - carbon monoxide system: on the doorstep of the clinic? *Can J Physiol Pharmacol*, 2008. 86(9): p. 577-99.
63. Alam, J. and J.L. Cook, Transcriptional regulation of the heme oxygenase-1 gene via the stress response element pathway. *Curr Pharm Des*, 2003. 9(30): p. 2499-511.
64. Kim, Y.M., et al., Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 2011. 14(1): p. 137-67.
65. Gozzelino, R., V. Jeney, and M.P. Soares, Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2010. 50: p. 323-54.

66. Abraham, N.G. and A. Kappas, Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev*, 2008. 60(1): p. 79-127.
67. Nath, K.A., et al., Heme protein-induced chronic renal inflammation: suppressive effect of induced heme oxygenase-1. *Kidney Int*, 2001. 59(1): p. 106-17.
68. Wiesel, P., et al., Endotoxin-induced mortality is related to increased oxidative stress and end-organ dysfunction, not refractory hypotension, in heme oxygenase-1-deficient mice. *Circulation*, 2000. 102(24): p. 3015-22.
69. Verma, A., et al., Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science*, 1993. 259(5093): p. 381-4.
70. Wang, R., Resurgence of carbon monoxide: an endogenous gaseous vasorelaxing factor. *Can J Physiol Pharmacol*, 1998. 76(1): p. 1-15.
71. Wang, R. and L. Wu, Interaction of selective amino acid residues of K(ca) channels with carbon monoxide. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2003. 228(5): p. 474-80.
72. Leffler, C.W., H. Parfenova, and J.H. Jaggar, Carbon monoxide as an endogenous vascular modulator. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. 301(1): p. H1-H11.
73. Guo, Y., et al., Administration of a CO-releasing molecule at the time of reperfusion reduces infarct size in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. 286(5): p. H1649-53.
74. Stocker, R., et al., Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, 1987. 235(4792): p. 1043-6.
75. Kwak, J.Y., et al., Bilirubin inhibits the activation of superoxide-producing NADPH oxidase in a neutrophil cell-free system. *Biochim Biophys Acta*, 1991. 1076(3): p. 369-73.
76. Clark, J.E., et al., Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. 278(2): p. H643-51.
77. Gourley, G.R., Bilirubin metabolism and kernicterus. *Adv Pediatr*, 1997. 44: p. 173-229.
78. Weitzman, M.D. and R.M. Linden, Adeno-associated virus biology. *Methods Mol Biol*, 2011. 807: p. 1-23.

79. Wang, J., S.M. Faust, and J.E. Rabinowitz, The next step in gene delivery: molecular engineering of adeno-associated virus serotypes. *J Mol Cell Cardiol*, 2011. 50(5): p. 793-802.
80. Mueller, C. and T.R. Flotte, Clinical gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther*, 2008. 15(11): p. 858-63.
81. Choi, V.W., D.M. McCarty, and R.J. Samulski, AAV hybrid serotypes: improved vectors for gene delivery. *Curr Gene Ther*, 2005. 5(3): p. 299-310.
82. Samulski, R.J., et al., Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. 79(6): p. 2077-81.
83. Chaanine, A.H., J. Kalman, and R.J. Hajjar, Cardiac gene therapy. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 2010. 22(2): p. 127-39.
84. Evans, C.H., et al., Gene therapeutic approaches-transfer in vivo. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006. 58(2): p. 243-58.
85. Hacein-Bey-Abina, S., et al., LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 2003. 302(5644): p. 415-9.
86. Van Vliet, K.M., et al., The role of the adeno-associated virus capsid in gene transfer. *Methods Mol Biol*, 2008. 437: p. 51-91.
87. Afione, S.A., et al., In vivo model of adeno-associated virus vector persistence and rescue. *J Virol*, 1996. 70(5): p. 3235-41.
88. Woo, Y.J., et al., One year transgene expression with adeno-associated virus cardiac gene transfer. *Int J Cardiol*, 2005. 100(3): p. 421-6.
89. Coura Rdos, S. and N.B. Nardi, The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *Virol J*, 2007. 4: p. 99.
90. Bish, L.T., et al., Adeno-associated virus (AAV) serotype 9 provides global cardiac gene transfer superior to AAV1, AAV6, AAV7, and AAV8 in the mouse and rat. *Hum Gene Ther*, 2008. 19(12): p. 1359-68.
91. Melo, L.G., et al., Gene therapy strategy for long-term myocardial protection using adeno-associated virus-mediated delivery of heme oxygenase gene. *Circulation*, 2002. 105(5): p. 602-7.

92. Kaplitt, M.G., et al., Long-term gene transfer in porcine myocardium after coronary infusion of an adeno-associated virus vector. *Ann Thorac Surg*, 1996. 62(6): p. 1669-76.
93. Sharma, A., et al., Transduction efficiency of AAV 2/6, 2/8 and 2/9 vectors for delivering genes in human corneal fibroblasts. *Brain Res Bull*, 2010. 81(2-3): p. 273-8.
94. Pacak, C.A., et al., Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circ Res*, 2006. 99(4): p. e3-9.
95. French, B.A., et al., Direct in vivo gene transfer into porcine myocardium using replication-deficient adenoviral vectors. *Circulation*, 1994. 90(5): p. 2414-24.
96. Boekstegers, P., et al., Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins. *Gene Ther*, 2000. 7(3): p. 232-40.
97. Boekstegers, P., et al., Selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins as an alternative access of ischemic myocardium: implications for myocardial protection, myocardial gene transfer and angiogenesis. *Z Kardiol*, 2000. 89 Suppl 9: p. IX/109-12.
98. Kupatt, C., et al., Selective retroinfusion of GSH and cariporide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in a preclinical pig model. *Cardiovasc Res*, 2004. 61(3): p. 530-7.
99. Kupatt, C., et al., VEGF165 transfection decreases postischemic NF-kappa B-dependent myocardial reperfusion injury in vivo: role of eNOS phosphorylation. *FASEB J*, 2003. 17(6): p. 705-7.
100. Chomczynski, P. and N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987. 162(1): p. 156-9.
101. Oropeza, M., et al., Transgenic expression of the human A20 gene in cloned pigs provides protection against apoptotic and inflammatory stimuli. *Xenotransplantation*, 2009. 16(6): p. 522-34.
102. Smith, P.K., et al., Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 1985. 150(1): p. 76-85.
103. Kupatt, C., et al., Cotransfection of vascular endothelial growth factor-A and platelet-derived growth factor-B via recombinant adeno-associated virus resolves chronic ischemic malperfusion role of vessel maturation. *J Am Coll Cardiol*, 2010. 56(5): p. 414-22.

104. Petersen, B., et al., Development and validation of a highly efficient protocol of porcine somatic cloning using preovulatory embryo transfer in peripubertal gilts. *Cloning Stem Cells*, 2008. 10(3): p. 355-62.
105. Meerbaum, S., et al., Diastolic retroperfusion of acutely ischemic myocardium. *Am J Cardiol*, 1976. 37(4): p. 588-98.
106. von Degenfeld, G., W. Giehl, and P. Boekstegers, Targeting of dobutamine to ischemic myocardium without systemic effects by selective suction and pressure-regulated retroinfusion. *Cardiovasc Res*, 1997. 35(2): p. 233-40.
107. Kupatt, C., et al., Heat shock protein 90 transfection reduces ischemia-reperfusion-induced myocardial dysfunction via reciprocal endothelial NO synthase serine 1177 phosphorylation and threonine 495 dephosphorylation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. 24(8): p. 1435-41.
108. Bugge-Asperheim, B., S. Leraand, and F. Kiil, Local dimensional changes of the myocardium measured by ultrasonic technique. *Scand J Clin Lab Invest*, 1969. 24(4): p. 361-71.
109. Hagl, S., et al., [Direct measurement of papillary muscle dynamics in the intact canine left ventricle during acute coronary occlusion (author's transl)]. *Thoraxchir Vask Chir*, 1976. 24(4): p. 303-8.
110. Harada, K., et al., Vascular endothelial growth factor administration in chronic myocardial ischemia. *Am J Physiol*, 1996. 270(5 Pt 2): p. H1791-802.
111. Gavrieli, Y., Y. Sherman, and S.A. Ben-Sasson, Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 1992. 119(3): p. 493-501.
112. Wheeler, D.G., et al., Transgenic swine: expression of human CD39 protects against myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol*, 2012. 52(5): p. 958-61.
113. Chu, C.R., M. Szczodry, and S. Bruno, Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue Eng Part B Rev*, 2010. 16(1): p. 105-15.
114. Kreissl, M.C., et al., Noninvasive measurement of cardiovascular function in mice with high-temporal-resolution small-animal PET. *J Nucl Med*, 2006. 47(6): p. 974-80.
115. Heusch, G., A. Skyschally, and R. Schulz, The in-situ pig heart with regional ischemia/reperfusion - ready for translation. *J Mol Cell Cardiol*, 2011. 50(6): p. 951-63.

116. Bode, G., et al., The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2010. 62(3): p. 196-220.
117. Ikeno, F., et al., Impaired perfusion after myocardial infarction is due to reperfusion-induced deltaPKC-mediated myocardial damage. *Cardiovasc Res*, 2007. 73(4): p. 699-709.
118. Aigner, B., et al., Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *J Mol Med (Berl)*, 2010. 88(7): p. 653-64.
119. Betthausen, J., et al., Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nat Biotechnol*, 2000. 18(10): p. 1055-9.
120. Zhang, Z., et al., Animal models in xenotransplantation. *Expert Opin Investig Drugs*, 2000. 9(9): p. 2051-68.
121. Cao, J., et al., High fat diet enhances cardiac abnormalities in SHR rats: Protective role of heme oxygenase-adiponectin axis. *Diabetol Metab Syndr*, 2011. 3(1): p. 37.
122. Penumathsa, S.V., et al., Secoisolariciresinol diglucoside induces neovascularization-mediated cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in hypercholesterolemic myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 2008. 44(1): p. 170-9.
123. Liu, X., et al., Absence of heme oxygenase-1 exacerbates myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic mice. *Diabetes*, 2005. 54(3): p. 778-84.
124. Hausenloy, D.J., et al., Translating novel strategies for cardioprotection: the Hatter Workshop Recommendations. *Basic Res Cardiol*, 2010. 105(6): p. 677-86.
125. Otterbein, L.E. and A.M. Choi, Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000. 279(6): p. L1029-37.
126. Wu, M.L., Y.C. Ho, and S.F. Yet, A central role of heme oxygenase-1 in cardiovascular protection. *Antioxid Redox Signal*, 2011. 15(7): p. 1835-46.
127. Ma, J., et al., A cell penetrating heme oxygenase protein protects heart graft against ischemia/reperfusion injury. *Gene Ther*, 2009. 16(3): p. 320-8.
128. Yet, S.F., et al., Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circ Res*, 2001. 89(2): p. 168-73.

129. Pachori, A.S., et al., Hypoxia-regulated therapeutic gene as a preemptive treatment strategy against ischemia/reperfusion tissue injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(33): p. 12282-7.
130. Liu, X., et al., Preemptive heme oxygenase-1 gene delivery reveals reduced mortality and preservation of left ventricular function 1 yr after acute myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. 293(1): p. H48-59.
131. Jiang, Y., et al., HO-1 gene overexpression enhances the beneficial effects of superparamagnetic iron oxide labeled bone marrow stromal cells transplantation in swine hearts underwent ischemia/reperfusion: an MRI study. *Basic Res Cardiol*, 2010. 105(3): p. 431-42.
132. Kupatt, C., et al., Retroinfusion of NFkappaB decoy oligonucleotide extends cardioprotection achieved by CD18 inhibition in a preclinical study of myocardial ischemia and retroinfusion in pigs. *Gene Ther*, 2002. 9(8): p. 518-26.
133. Li, Q., et al., Gene transfer as a strategy to achieve permanent cardioprotection II: rAAV-mediated gene therapy with heme oxygenase-1 limits infarct size 1 year later without adverse functional consequences. *Basic Res Cardiol*, 2011. 106(6): p. 1367-77.
134. Masini, E., et al., Heme oxygenase-1 and the ischemia-reperfusion injury in the rat heart. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2003. 228(5): p. 546-9.
135. Wang, G., et al., Riboflavin alleviates cardiac failure in Type I diabetic cardiomyopathy. *Heart Int*, 2011. 6(2): p. e21.
136. Tang, Y.L., et al., A vigilant, hypoxia-regulated heme oxygenase-1 gene vector in the heart limits cardiac injury after ischemia-reperfusion in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2005. 10(4): p. 251-63.
137. Pachori, A.S., et al., Chronic recurrent myocardial ischemic injury is significantly attenuated by pre-emptive adeno-associated virus heme oxygenase-1 gene delivery. *J Am Coll Cardiol*, 2006. 47(3): p. 635-43.
138. Liu, X., et al., Heme oxygenase-1 (HO-1) inhibits postmyocardial infarct remodeling and restores ventricular function. *FASEB J*, 2006. 20(2): p. 207-16.
139. Csonka, C., et al., Heme oxygenase and cardiac function in ischemic/reperfused rat hearts. *Free Radic Biol Med*, 1999. 27(1-2): p. 119-26.
140. Wojakowski, W., et al., Effects of intracoronary delivery of allogenic bone marrow-derived stem cells expressing heme oxygenase-1 on myocardial reperfusion injury. *Thromb Haemost*, 2012. 108(3): p. 464-75.

141. Shibata, I., et al., Milrinone and levosimendan administered after reperfusion improve myocardial stunning in swine. *Scand Cardiovasc J*, 2013. 47(1): p. 50-7.
142. Kosugi, T., et al., Radical scavenging properties of novel benzopyran derivatives, TA248 and TA276, and effects of the compounds on ischemic/reperfused myocardium in dogs. *J Pharm Sci*, 2000. 89(9): p. 1114-22.
143. Berne, J.P., et al., Carbon monoxide protects against ischemia-reperfusion injury in vitro via antioxidant properties. *Cell Physiol Biochem*, 2012. 29(3-4): p. 475-84.
144. Stein, A.B., et al., Carbon monoxide induces a late preconditioning-mimetic cardioprotective and antiapoptotic milieu in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 2012. 52(1): p. 228-36.
145. Clark, J.E., et al., Cardioprotective actions by a water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. *Circ Res*, 2003. 93(2): p. e2-8.
146. Foresti, R., et al., Role of heme oxygenase-1 in hypoxia-reoxygenation: requirement of substrate heme to promote cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. 281(5): p. H1976-84.
147. Cobb, N. and R.A. Etzel, Unintentional carbon monoxide-related deaths in the United States, 1979 through 1988. *JAMA*, 1991. 266(5): p. 659-63.
148. Henry, C.R., et al., Myocardial injury and long-term mortality following moderate to severe carbon monoxide poisoning. *JAMA*, 2006. 295(4): p. 398-402.
149. Satran, D., et al., Cardiovascular manifestations of moderate to severe carbon monoxide poisoning. *J Am Coll Cardiol*, 2005. 45(9): p. 1513-6.
150. Peers, C. and D.S. Steele, Carbon monoxide: a vital signalling molecule and potent toxin in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 2012. 52(2): p. 359-65.
151. Giannini, L., et al., Protection from cardiac injury by induction of heme oxygenase-1 and nitric oxide synthase in a focal ischaemia-reperfusion model. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2005. 51(4): p. 393-401.
152. Katori, M., et al., Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway. *Transplantation*, 2002. 73(2): p. 287-92.
153. Dirksen, M.T., et al., Reperfusion injury in humans: a review of clinical trials on reperfusion injury inhibitory strategies. *Cardiovasc Res*, 2007. 74(3): p. 343-55.

154. Staat, P., et al., Postconditioning the human heart. *Circulation*, 2005. 112(14): p. 2143-8.
155. Dirksen, M.T., et al., The effect of ITF-1697 on reperfusion in patients undergoing primary angioplasty. Safety and efficacy of a novel tetrapeptide, ITF-1697. *Eur Heart J*, 2004. 25(5): p. 392-400.
156. Wang, Q.D., et al., Pharmacological possibilities for protection against myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 2002. 55(1): p. 25-37.
157. Sabia, P.J., et al., An association between collateral blood flow and myocardial viability in patients with recent myocardial infarction. *N Engl J Med*, 1992. 327(26): p. 1825-31.
158. Bolli, R., et al., Myocardial protection at a crossroads: the need for translation into clinical therapy. *Circ Res*, 2004. 95(2): p. 125-34.
159. Yeh, C.H., et al., HO-1 activation can attenuate cardiomyocytic apoptosis via inhibition of NF-kappaB and AP-1 translocation following cardiac global ischemia and reperfusion. *J Surg Res*, 2009. 155(1): p. 147-56.
160. Araujo, J.A., M. Zhang, and F. Yin, Heme oxygenase-1, oxidation, inflammation, and atherosclerosis. *Front Pharmacol*, 2012. 3: p. 119.
161. Wagener, F.A., et al., Differential effects of heme oxygenase isoforms on heme mediation of endothelial intracellular adhesion molecule 1 expression. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. 291(1): p. 416-23.
162. Sacerdoti, D., et al., Heme oxygenase-1 transduction in endothelial cells causes downregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and of genes involved in inflammation and growth. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2005. 51(4): p. 363-70.
163. Kawamura, K., et al., Bilirubin from heme oxygenase-1 attenuates vascular endothelial activation and dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(1): p. 155-60.
164. An, L., et al., Heme oxygenase-1 system, inflammation and ventilator-induced lung injury. *Eur J Pharmacol*, 2012. 677(1-3): p. 1-4.
165. Morse, D., et al., Suppression of inflammatory cytokine production by carbon monoxide involves the JNK pathway and AP-1. *J Biol Chem*, 2003. 278(39): p. 36993-8.

166. Ahanger, A.A., et al., Pro-healing potential of hemin: an inducer of heme oxygenase-1. *Eur J Pharmacol*, 2010. 645(1-3): p. 165-70.
167. Lee, T.S. and L.Y. Chau, Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med*, 2002. 8(3): p. 240-6.
168. Paine, A., et al., Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochem Pharmacol*, 2010. 80(12): p. 1895-903.
169. Yin, H., et al., Heme oxygenase-1 upregulation improves lipopolysaccharide-induced acute lung injury involving suppression of macrophage migration inhibitory factor. *Mol Immunol*, 2010. 47(15): p. 2443-9.
170. Wang, X.M., et al., The heme oxygenase-1/carbon monoxide pathway suppresses TLR4 signaling by regulating the interaction of TLR4 with caveolin-1. *J Immunol*, 2009. 182(6): p. 3809-18.
171. Ke, B., et al., HO-1-STAT3 axis in mouse liver ischemia/reperfusion injury: regulation of TLR4 innate responses through PI3K/PTEN signaling. *J Hepatol*, 2012. 56(2): p. 359-66.
172. Shen, X.D., et al., Toll-like receptor and heme oxygenase-1 signaling in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant*, 2005. 5(8): p. 1793-800.
173. Otterbein, L.E., et al., Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med*, 2000. 6(4): p. 422-8.
174. Bilban, M., et al., Heme oxygenase and carbon monoxide initiate homeostatic signaling. *J Mol Med (Berl)*, 2008. 86(3): p. 267-79.
175. Song, R., et al., Regulation of IL-1 β -induced GM-CSF production in human airway smooth muscle cells by carbon monoxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003. 284(1): p. L50-6.
176. Soares, M.P., et al., Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation. *J Immunol*, 2004. 172(6): p. 3553-63.
177. Dal-Secco, D., et al., Reduction of ICAM-1 expression by carbon monoxide via soluble guanylate cyclase activation accounts for modulation of neutrophil migration. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2010. 381(6): p. 483-93.

178. Nakahira, K., et al., Carbon monoxide differentially inhibits TLR signaling pathways by regulating ROS-induced trafficking of TLRs to lipid rafts. *J Exp Med*, 2006. 203(10): p. 2377-89.
179. Keshavan, P., et al., Unconjugated bilirubin inhibits VCAM-1-mediated transendothelial leukocyte migration. *J Immunol*, 2005. 174(6): p. 3709-18.
180. Vijayan, V., et al., Heme oxygenase-1 as a therapeutic target in inflammatory disorders of the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol*, 2010. 16(25): p. 3112-9.
181. Nakao, A., et al., Biliverdin protects the functional integrity of a transplanted syngeneic small bowel. *Gastroenterology*, 2004. 127(2): p. 595-606.
182. Richards, J.A., S.J. Wigmore, and L.R. Devey, Heme oxygenase system in hepatic ischemia-reperfusion injury. *World J Gastroenterol*, 2010. 16(48): p. 6068-78.
183. Ryter, S.W., D. Morse, and A.M. Choi, Carbon monoxide and bilirubin: potential therapies for pulmonary/vascular injury and disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007. 36(2): p. 175-82.
184. Vulapalli, S.R., et al., Cardiospecific overexpression of HO-1 prevents I/R-induced cardiac dysfunction and apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. 283(2): p. H688-94.
185. Wang, G., et al., Cardioprotective and antiapoptotic effects of heme oxygenase-1 in the failing heart. *Circulation*, 2010. 121(17): p. 1912-25.
186. Lakkisto, P., et al., Heme oxygenase-1 induction protects the heart and modulates cellular and extracellular remodelling after myocardial infarction in rats. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2011. 236(12): p. 1437-48.
187. Brouard, S., et al., Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, 2002. 277(20): p. 17950-61.
188. Akamatsu, Y., et al., Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide protects hearts from transplant associated ischemia reperfusion injury. *FASEB J*, 2004. 18(6): p. 771-2.
189. Soares, M.P., et al., Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat Med*, 1998. 4(9): p. 1073-7.
190. Brouard, S., et al., Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med*, 2000. 192(7): p. 1015-26.

191. Silva, G., et al., The antiapoptotic effect of heme oxygenase-1 in endothelial cells involves the degradation of p38 alpha MAPK isoform. *J Immunol*, 2006. 177(3): p. 1894-903.
192. Tsui, T.Y., et al., Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide stimulates adenosine triphosphate generation in human hepatocyte. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 336(3): p. 898-902.
193. Yano, Y., et al., Genetic ablation of the transcription repressor Bach1 leads to myocardial protection against ischemia/reperfusion in mice. *Genes Cells*, 2006. 11(7): p. 791-803.
194. Zhang, X., et al., Carbon monoxide inhibition of apoptosis during ischemia-reperfusion lung injury is dependent on the p38 mitogen-activated protein kinase pathway and involves caspase 3. *J Biol Chem*, 2003. 278(2): p. 1248-58.
195. Kim, J.H., et al., Heme oxygenase-1 protects rat kidney from ureteral obstruction via an antiapoptotic pathway. *J Am Soc Nephrol*, 2006. 17(5): p. 1373-81.
196. Liu, X.M., et al., Carbon monoxide inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*, 2002. 55(2): p. 396-405.
197. Wang, X., et al., Carbon monoxide protects against hyperoxia-induced endothelial cell apoptosis by inhibiting reactive oxygen species formation. *J Biol Chem*, 2007. 282(3): p. 1718-26.
198. Soares, M.P., et al., Modulation of endothelial cell apoptosis by heme oxygenase-1-derived carbon monoxide. *Antioxid Redox Signal*, 2002. 4(2): p. 321-9.
199. Zhang, X., et al., Carbon monoxide differentially modulates STAT1 and STAT3 and inhibits apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and p38 kinase-dependent STAT3 pathway during anoxia-reoxygenation injury. *J Biol Chem*, 2005. 280(10): p. 8714-21.
200. Zheng, M., et al., Sensing endoplasmic reticulum stress by protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase promotes adaptive mitochondrial DNA biogenesis and cell survival via heme oxygenase-1/carbon monoxide activity. *FASEB J*, 2012. 26(6): p. 2558-68.
201. Piantadosi, C.A., M.S. Carraway, and H.B. Suliman, Carbon monoxide, oxidative stress, and mitochondrial permeability pore transition. *Free Radic Biol Med*, 2006. 40(8): p. 1332-9.

202. Pachori, A.S., et al., Heme-Oxygenase-1 Induced Protection Against Hypoxia/Reoxygenation is Dependent on Biliverdin Reductase and its Interaction with PI3K/Akt Pathway. *J Mol Cell Cardiol*, 2007. 43(5): p. 580-92.
203. Burger, D., et al., Role of heme oxygenase-1 in the cardioprotective effects of erythropoietin during myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. 296(1): p. H84-93.
204. Vitali, S.H., et al., Divergent cardiopulmonary actions of heme oxygenase enzymatic products in chronic hypoxia. *PLoS One*, 2009. 4(6): p. e5978.
205. Liu, X.M., et al., Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene expression stimulates apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 2002. 105(1): p. 79-84.
206. Sass, G., et al., Cooperative effect of biliverdin and carbon monoxide on survival of mice in immune-mediated liver injury. *Hepatology*, 2004. 40(5): p. 1128-35.
207. Flotte, T.R., et al., Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study. *Hum Gene Ther*, 2003. 14(11): p. 1079-88.
208. Nathwani, A.C., et al., Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med*, 2011. 365(25): p. 2357-65.
209. Chan, K.H., M.K. Ng, and R. Stocker, Haem oxygenase-1 and cardiovascular disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)*, 2011. 120(12): p. 493-504.
210. Li, C., et al., Neutralizing antibodies against adeno-associated virus examined prospectively in pediatric patients with hemophilia. *Gene Ther*, 2012. 19(3): p. 288-94.
211. Moss, R.B., et al., Repeated aerosolized AAV-CFTR for treatment of cystic fibrosis: a randomized placebo-controlled phase 2B trial. *Hum Gene Ther*, 2007. 18(8): p. 726-32.
212. Jaski, B.E., et al., Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID Trial), a first-in-human phase 1/2 clinical trial. *J Card Fail*, 2009. 15(3): p. 171-81.
213. Pacak, C.A. and B.J. Byrne, AAV vectors for cardiac gene transfer: experimental tools and clinical opportunities. *Mol Ther*, 2011. 19(9): p. 1582-90.

214. Doberer, D., et al., Haem arginate infusion stimulates haem oxygenase-1 expression in healthy subjects. *Br J Pharmacol*, 2010. 161(8): p. 1751-62.
215. Bharucha, A.E., et al., First-in-human study demonstrating pharmacological activation of heme oxygenase-1 in humans. *Clin Pharmacol Ther*, 2010. 87(2): p. 187-90.
216. Shan, Y., et al., Role of Bach1 and Nrf2 in up-regulation of the heme oxygenase-1 gene by cobalt protoporphyrin. *FASEB J*, 2006. 20(14): p. 2651-3.
217. Kawamoto, S., et al., Heme oxygenase-1 induction enhances cell survival and restores contractility to unvascularized three-dimensional adult cardiomyocyte grafts implanted in vivo. *Tissue Eng Part A*, 2011. 17(11-12): p. 1605-14.
218. Li, M., et al., Treatment of obese diabetic mice with a heme oxygenase inducer reduces visceral and subcutaneous adiposity, increases adiponectin levels, and improves insulin sensitivity and glucose tolerance. *Diabetes*, 2008. 57(6): p. 1526-35.
219. Lundvig, D.M., S. Immenschuh, and F.A. Wagener, Heme oxygenase, inflammation, and fibrosis: the good, the bad, and the ugly? *Front Pharmacol*, 2012. 3: p. 81.
220. Lee, T.S., et al., Simvastatin induces heme oxygenase-1: a novel mechanism of vessel protection. *Circulation*, 2004. 110(10): p. 1296-302.
221. Ali, F., et al., Statin-mediated cytoprotection of human vascular endothelial cells: a role for Kruppel-like factor 2-dependent induction of heme oxygenase-1. *J Thromb Haemost*, 2007. 5(12): p. 2537-46.
222. Loboda, A., et al., Atorvastatin prevents hypoxia-induced inhibition of endothelial nitric oxide synthase expression but does not affect heme oxygenase-1 in human microvascular endothelial cells. *Atherosclerosis*, 2006. 187(1): p. 26-30.
223. He, M., et al., MicroRNA-155 regulates inflammatory cytokine production in tumor-associated macrophages via targeting C/EBPbeta. *Cell Mol Immunol*, 2009. 6(5): p. 343-52.
224. Pulkkinen, K.H., S. Yla-Herttuala, and A.L. Levonen, Heme oxygenase 1 is induced by miR-155 via reduced BACH1 translation in endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, 2011. 51(11): p. 2124-31.
225. Kumar, R., et al., Identification of a novel role of ESAT-6-dependent miR-155 induction during infection of macrophages with *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Microbiol*, 2012. 14(10): p. 1620-31.

226. Trang, P., et al., Systemic Delivery of Tumor Suppressor microRNA Mimics Using a Neutral Lipid Emulsion Inhibits Lung Tumors in Mice. *Mol Ther*, 2011. 19(6): p. 1116-22.
227. Davis, M.E., The first targeted delivery of siRNA in humans via a self-assembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticle: from concept to clinic. *Mol Pharm*, 2009. 6(3): p. 659-68.
228. Motterlini, R. and L.E. Otterbein, The therapeutic potential of carbon monoxide. *Nat Rev Drug Discov*, 2010. 9(9): p. 728-43.
229. Jozkowicz, A., H. Was, and J. Dulak, Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? *Antioxid Redox Signal*, 2007. 9(12): p. 2099-117.
230. Gesundheitsberichterstattung des Bundes: "Indikator 24 der ECHI shortlist: Fallrate akuter Myokardinfarkte (tödlich und nicht-tödlich) sowie koronare Sterbefälle je 100.000 Einwohner." (9.10.2014), URL: https://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=i&p_aid=89624989&nummer=801&p_sprache=D&p_indsp=-&p_aid=10572298#SOURCES (Stand: 09.10.2014).
231. Statistisches Bundesamt: "Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2011" (06.12.2012), URL: https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400117004.pdf?__blob=publicationFile (Stand: 08.10.2014).

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein allerherzlichster Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Christian Kupatt unter der ehemaligen klinischen Leitung von Herrn Prof. Gerhard Steinbeck. Insbesondere möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Christian Kupatt und meiner Betreuerin Dr. Rabea Hinkel bedanken. Sie haben mir dieses besonders interessante Dissertationsthema überlassen und mich methodisch und wissenschaftlich bestens unterstützt.

Ich möchte mich außerdem bei Tien-Cuong Kieu und Elisabeth Raatz für ihre großartige technische Assistenz bei der Vorbereitung und Durchführung der Experimente und für zahlreiche Hilfestellungen in ihren Arbeitsbereichen bedanken.

Ebenfalls bin ich sehr dankbar, dass ich an dem Förderungsprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) teilnehmen konnte. Durch dieses Förderungsprogramm bin ich mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Christian Kupatt in Kontakt gekommen. Durch zahlreiche Seminare wurde mein wissenschaftliches Denken im Rahmen meiner experimentellen Doktorarbeit erweitert.

Für die Genehmigung der Nutzung des Großtier-OPs im Walter-Brendel-Zentrum möchte ich mich an dieser Stelle auch herzlich bedanken.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Heiner Niemann vom Friedrich-Löffler-Institut für die Herstellung der transgenen Tiere.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich an dieser Stelle ebenfalls danken. Sie haben mich weniger fachlich, aber umso mehr moralisch und mit viel Verständnis und Motivation unterstützt. Ein besonderer Dank gilt Florian Fuchs.

Ihnen allen gilt mein großer Dank.