

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Schmitz

**Untersuchungen zum Einfluss der cAMP-regulierten
Transkriptionsfaktoren Activator Protein 2 α (AP-2 α) und
cAMP Response Element Modulator (CREM) auf die
Apoptose in isolierten Herzen**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Frank Thomas Stümpel

aus Münster

2009

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. F. U. Müller

2. Berichterstatter: Hdoz. Prof. Dr. med. L. Eckardt

Tag der mündlichen Prüfung: 18.09.2009

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Schmitz
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. F. U. Müller
Koreferent: Hdoz. Prof. Dr. med. L. Eckardt

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen zum Einfluss der cAMP-regulierten Transkriptionsfaktoren Activator Protein 2 α (AP-2 α) und cAMP Response Element Modulator (CREM) auf die Apoptose in isolierten Herzen

Frank Thomas Stümpel

Die Herzinsuffizienz ist eine der Hauptursachen von Morbidität und Mortalität in westlichen Industrienationen. Bei ihrem Fortschreiten kommt es zu einer Störung der Signalübertragung über den intrazellulären Botenstoff zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Auch lässt sich im Rahmen der Herzinsuffizienz eine gesteigerte Apoptose von Kardiomyozyten beobachten. Activator Protein 2 α (AP-2 α) und cAMP Response Element Modulator (CREM) sind zwei Transkriptionsfaktoren, die Gene cAMP-abhängig regulieren können. Beide werden im menschlichen Herzen exprimiert. Die Expression von AP-2 α ist bei der idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie heraufreguliert, und eine Überexpression von AP-2 α löst Apoptose in Kardiomyozyten aus. Die dominant negative CREM-Isoform Inducible cAMP Early Repressor (ICER) stimuliert Apoptose in Kardiomyozyten. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine heterozygote Ausschaltung des AP-2 α -Gens (eine globale homozygote Ausschaltung ist mit dem Leben nicht vereinbar) sowie eine vollständige Ausschaltung des CREM-Gens keinen Einfluss auf die Ausbildung von Apoptose durch Ischämie und Reperfusion in isolierten Herzen hat. Möglicherweise kommt dieser fehlende Einfluss jedoch durch das vorhandene intakte Allel (im Fall von AP-2 α) bzw. durch Kompensation durch ähnliche Transkriptionsfaktoren (im Fall von CREM) zustande. Beide Transkriptionsfaktoren bleiben lohnende Ziele weiterer Untersuchungen an anderen Modellen, um die angesprochenen Fragestellungen zu klären.

Tag der mündlichen Prüfung: 18.09.2009

Für meine Eltern
Ursula und Leo Stümpel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Herzinsuffizienz	1
1.2	Apoptose	3
1.3	Der Transkriptionsfaktor AP-2 α	6
1.4	Der Transkriptionsfaktor CREM	8
1.5	Fragestellung, Ziele und Ergebnisse	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Tierlinien	13
2.1.1	<i>Ap-2α^{-/+}</i> -Tiere	13
2.1.2	<i>Crem^{-/-}</i> -Tiere	13
2.2	Langendorff-Perfusion	14
2.2.1	Beschreibung des Verfahrens	14
2.2.2	Präparation der Herzen	14
2.2.3	Ablauf des Versuchs	14
2.2.4	Verwendete Lösungen	15
2.3	Nachweis von DNA-Fragmentierung	15
2.3.1	DNA-Gewinnung	15
2.3.2	Gelelektrophorese	16
2.3.3	Auswertung	16
2.3.4	Verwendete Lösungen und Standards	17
2.4	Western Blots	18
2.4.1	Gewebeaufarbeitung	18
2.4.2	Gelelektrophorese und Blot	19
2.4.3	Immunologischer Nachweis von gespaltenem Lamin A und Calsequestrin	19
2.4.4	Auswertung	19
2.4.5	Verwendete Lösungen und Chemikalien	20
2.5	Caspase 3/7-Assay	22
2.5.1	Gewebeaufarbeitung	22

2.5.2	Messung der Caspase 3/7-Aktivität	22
2.5.3	Auswertung	22
2.5.4	Verwendete Lösungen und Chemikalien	23
3	Ergebnisse	24
3.1	Validierung der verwendeten Methoden	24
3.1.1	Abhängigkeit der DNA-Fragmentierung von der Ischämiedauer	24
3.1.2	Positivproben für den Lamin A-Antikörper	24
3.1.3	Abhängigkeit der Caspase 3/7-Aktivität von der Ischämiedauer	25
3.2	Untersuchungen an der <i>Ap-2α^{-/+}</i> -Linie	25
3.2.1	Apoptosenachweis durch DNA-Fragmentierung	26
3.2.2	Apoptosenachweis mittels Western Blot	26
3.2.3	Apoptosenachweis mittels Caspase 3/7-Aktivitätsmessung	27
3.3	Untersuchungen an der <i>Crem^{-/-}</i> -Linie	27
3.3.1	Apoptosenachweis durch DNA-Fragmentierung	27
3.3.2	Apoptosenachweis mittels Caspase 3/7-Aktivitätsmessung	28
	Abbildungen	29
4	Diskussion	41
4.1	Hauptergebnisse der Arbeit	41
4.2	Methoden zur experimentellen Auslösung und Erfassung von Apoptose im adulten Herzen	41
4.3	Ergebnisse der Untersuchungen an heterozygoten <i>Ap-2α^{-/+}</i> -Tieren	45
4.4	Ergebnisse der Untersuchungen an <i>Crem</i> -Knockouttieren	46
5	Zusammenfassung und Ausblick	49
6	Literaturverzeichnis	50
7	Abkürzungsverzeichnis	72
8	Danksagung	76
9	Lebenslauf	78

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist pathophysiologisch definiert als Zustand, bei dem das Herz nicht mehr in der Lage ist, die Gewebe mit genügend Blut und damit genügend Sauerstoff zu versorgen, um den Gewebestoffwechsel in Ruhe oder unter Belastung sicherzustellen; klinisch liegt dann eine Herzinsuffizienz vor, wenn typische Symptome (Dyspnoe, Müdigkeit, Flüssigkeitsretention) vorliegen, denen ursächlich eine kardiale Funktionsstörung zugrunde liegt (Definition der WHO von 1995, zitiert nach Hoppe et al. 2005).

Auch heutzutage ist die chronische Herzinsuffizienz eine Krankheit mit sehr schlechter Prognose. Zwar stieg die Fünfjahres-Überlebensrate in einer Untersuchung der Framingham-Studiengruppe zwischen 1950 und 1999 an (von 30 Prozent bei Männern und 43 Prozent bei Frauen im Untersuchungszeitraum von 1950 bis 1969 auf 41 Prozent bei Männern und 55 Prozent bei Frauen im Zeitraum von 1990 bis 1999), trotzdem ist die Prognose damit aber immer noch vergleichbar schlecht oder sogar schlechter als die vieler maligner Neoplasien (Ho et al. 1993, Levy et al. 2002).

In Deutschland liegt die Prävalenz der Herzinsuffizienz bei 2-3%. Dabei sind Männer altersadjustiert doppelt so häufig betroffen wie Frauen (Fischer et al. 2003a, Fischer et al. 2003b). Da die Inzidenz der Herzinsuffizienz mit steigendem Alter ansteigt, muss damit gerechnet werden, dass etwa jeder fünfte Mann und jede sechste Frau in ihrem Leben an einer Herzinsuffizienz erkranken werden (Baessler et al. 2003).

Insgesamt ist zu erwarten, dass die Herzinsuffizienz – trotz zwischenzeitlich gleichbleibender oder sogar leicht sinkender Inzidenz (Levy et al. 2002) – aufgrund der veränderten Altersstruktur der Bevölkerung und dem verbesserten Überleben nach Herzinfarkt (einer Hauptursache der Herzinsuffizienz) ein wachsendes Gesundheitsproblem in industrialisierten Ländern bleiben wird (Coats 1998).

Bei Patienten mit Herzinsuffizienz findet man typischerweise eine neurohumorale Aktivierung mit erhöhten Plasmakatecholaminen, so dass die abnehmende Pumpleistung des Herzens zunächst kompensiert werden kann (Daly und Sole

1990, Cohn et al. 1984). Diese trägt zunächst zur hämodynamischen Stabilisierung bei, längerfristig scheint sie jedoch das Fortschreiten der Erkrankung zu beschleunigen. Ein Hinweis darauf ist, dass die Therapie der Herzinsuffizienz mit positiv inotropen Pharmaka (β -Adrenozeptoragonisten und Hemmstoffe der Phosphodiesterase 3) nur kurzfristig die hämodynamische Situation verbessert, während ihr Einsatz in der Langzeittherapie zu einer Verschlechterung der Prognose und einer Erhöhung der Mortalität führt (O'Connor et al. 1999, Cohn et al. 1998, Nony et al. 1994, Packer et al. 1991, Uretsky et al. 1990, The Xamoterol in Severe Heart Failure Study Group 1990, Sinoway et al. 1983). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit β -Adrenozeptorantagonisten zu einer Verbesserung der Prognose führt sowie die Herzfunktion verbessert und morphologische Veränderungen teilweise rückgängig macht (Bristow et al. 1996, Australia/New Zealand Heart Failure Research Collaborative Group 1997, Groenning et al. 2000, Hjalmarson et al. 2000, Kim et al. 1999, Lowes et al. 1999, Packer et al. 1996a, Packer et al. 1996b, Packer et al. 2001). Diese klinischen Befunde, die auf eine Störung der Signalübertragung durch β -Adrenozeptoren und ihren intrazellulären zweiten Botenstoff („second messenger“) cAMP hinweisen, lassen sich auch *in-vitro* bestätigen. Versuche an Myokardproben aus explantierten insuffizienten menschlichen Herzen zeigten im Vergleich mit Proben aus explantierten nicht insuffizienten Herzen eine verminderte Antwort auf β -Adrenozeptoragonisten und Phosphodiesterasehemmstoffe, während die cAMP-unabhängige Stimulation – z. B. durch Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration oder durch Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase – nicht verändert war. Das insuffiziente Myokard ist also prinzipiell zur gleichen Kraftentwicklung fähig wie nicht insuffizientes Myokard (Schmitz et al. 1987, Bristow et al. 1982). Weiterhin zeigte sich in insuffizienten Herzen eine verminderte β_1 -Rezeptordichte (Bristow et al. 1982) bei gleichzeitig erhöhter Expression des inhibitorischen GTP-bindenden Proteins G_i (Feldmann et al. 1988, Neumann et al. 1988, Böhm et al. 1990). Diese Veränderungen lassen eine verminderte Adenylatcyclaseaktivität erwarten, was durch Untersuchungen unterstützt wird, die in insuffizienten Herzen eine erniedrigte cAMP-Konzentration – sowohl basal als auch nach β -adrenerger Stimulation – zeigten (Danielsen et al. 1989,

Böhm et al. 1994). Neben den genannten, die cAMP-abhängige Signalübertragung betreffenden Expressionsveränderungen zeigten sich auch Veränderungen in der Expression von Proteinen der myokardialen Kalziumhomöostase sowie von Proteinen des kontraktilen Apparates, die insgesamt zur kontraktilen Dysfunktion des insuffizienten Herzens beitragen (Übersichten bei Eschenhagen et al. 1992a, Schmitz et al. 1996, Mittmann et al. 1998, El-Armouche et al. 2003). Ähnliche Expressionsveränderungen wie bei der menschlichen Herzinsuffizienz ließen sich im Tiermodell durch eine chronische β -adrenerge Stimulation auslösen (Eschenhagen et al. 1991, Eschenhagen et al. 1992b, Mende et al. 1992, Linck et al. 1998, Boknik et al. 2000), während beim Menschen die schon oben erwähnte Behandlung mit β -Adrenozeptorantagonisten zur teilweisen Rückbildung dieser Veränderungen führte (Sigmund et al. 1996). Dieses unterstreicht die wichtige Bedeutung einer chronischen β -adrenergen Stimulation bei der Ausbildung der typischen Pathophysiologie der Herzinsuffizienz.

Die genauen Mechanismen, die zu den beschriebenen Expressionsveränderungen bei Herzinsuffizienz führen, sind bisher nicht bekannt. Jedoch ist die Regulation durch Transkriptionsfaktoren ein wichtiger Mechanismus einer cAMP-abhängigen Genregulation und damit ein mögliches Bindeglied zwischen der neurohumoralen Aktivierung bei Herzinsuffizienz und den myokardialen Expressionsveränderungen (Übersicht bei Müller et al. 2000). Zwei Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität durch cAMP reguliert werden kann, werden in dieser Arbeit näher betrachtet.

1.2 Apoptose

Der Begriff Apoptose (von gr. ἀπόπτωσις: Herabfallen – das Fallen der Blätter im Herbst) wurde von Kerr et al. (1972) als Bezeichnung für den Vorgang eines programmierten, aktiv kontrollierten Zelltodes vorgeschlagen und anhand morphologischer Kriterien definiert: Zunächst kondensiert das Chromatin an der inneren Kernmembran, während sich Zell- und Kernmembran stark falten, dann zerfällt die untergehende Zelle in einzelne, membranumhüllte Fragmente, die schließlich von umgebenden Zellen phagozytiert werden.

Als eines der ersten biochemischen Zeichen für einen apoptotischen Zelluntergang fand Wyllie (1980) eine typische Fragmentierung der nukleären DNA. Dabei wird diese durch im Rahmen des apoptotischen Geschehens aktivierte endogene Endonukleasen zwischen Nukleosomen geschnitten, so dass sich Fragmente ergeben, die charakteristischerweise eine Länge von Vielfachen von 180 bp haben.

Untersuchungen der Embryonalentwicklung des Rundwurms *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) führten zu ersten Einblicken in die Genetik und die Signalwege der Apoptose. Studien an Mutanten, die Veränderungen im normalen Apoptosemuster zeigten, ermöglichten die Identifikation zweier Gene *ced-3* und *ced-4*, die für ein normales Funktionieren der Apoptose notwendig sind (Ellis und Horvitz 1986), sowie die Identifikation eines Genes *ced-9*, das Apoptose inhibieren kann (Hengartner et al. 1992).

Inzwischen wurden für diese Gene ein oder mehrere Homologe in Vertebraten identifiziert:

Das Genprodukt von *ced-3* ist homolog zu einer Gruppe von Proteasen, deren Prototyp das Interleukin-Konversionsenzym (ICE) ist (Yuan et al. 1993), und die aufgrund ihrer katalytischen Eigenschaften später als Cystein-abhängige Aspartat-spezifische Proteasen oder Caspasen bezeichnet wurden (Alnemri et al. 1996). Neben einigen an der Entzündungsreaktion beteiligten Enzymen gehören hierzu auch die Caspasen 2, 8, 9 und 10, die bei der Initiierung der Apoptose über intra- oder extrazelluläre Signale eine zentrale Rolle spielen, sowie die Caspasen 3, 6 und 7, die die zentralen Effektorenzyme des Apoptosevorgangs sind, indem sie z. B. Strukturproteine spalten oder weitere Enzyme proteolytisch aktivieren bzw. inaktivieren. So wird etwa die oben erwähnte DNA-Fragmentierung ausgelöst, indem Caspase 3 den Inhibitor (ICAD) der caspaseaktivierten DNase (CAD) deaktiviert (Liu et al. 1997, Sakahira et al. 1998).

Vom Genprodukt von *ced-4* ist bis heute nur ein Homolog bei Säugetieren und Menschen bekannt. Dieses wurde Apaf-1 (Apoptosis protease activating factor 1) genannt, da es (zusammen mit aus Mitochondrien freigesetztem Cytochrom c, s. u.) und Caspase 9 einen Komplex, das so genannte Apoptosom, bildet, der zur Aktivierung von Caspase 9 führt (Zou et al. 1997).

Das Genprodukt von *ced-9* ist homolog zu einer ganzen Gruppe von Säugetierproteinen. Der Prototyp dieser Gruppe ist Bcl-2, ein zuerst aus B-Zell-Lymphomen isoliertes Protein, das hier zur Immortalisierung der Tumorzellen beiträgt (Vaux et al. 1988). Es sind jedoch auch Proteine aus dieser Gruppe bekannt, die proapoptotisch wirken, wie z. B. Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer) oder Bax (Bcl-2 associated x protein). Man nimmt an, dass die Proteine dieser Gruppe die Durchlässigkeit der äußeren Mitochondrienmembran für Cytochrom c beeinflussen (Übersichten bei Antonsson & Martinou 2000, Scorrano & Korsmeyer 2003, Smali et al. 2003, Gustafsson & Gottlieb 2008).

Zur Aktivierung des Apoptosevorgangs in einer Zelle sind zwei Hauptsignalwege bekannt (Chang und Yang 2000):

Beim sogenannten extrinsischen oder rezeptorvermittelten Signalweg erhält die Zelle ein extrazelluläres Signal, das die Apoptosekaskade auslöst, indem an spezifische Rezeptoren entsprechende Liganden binden. Als Beispiel sei hier der Fas-Rezeptor und FasL (Fas-Ligand) genannt. Die Aktivierung des Rezeptors führt zur intrazellulären Bindung des Adapterproteins FADD (Fas associated death domain), das wiederum Procaspase 8 bindet. In diesem Komplex aus FADD und Procaspase 8 kommt es dann zur autokatalytischen Aktivierung der Procaspase zu Caspase 8, die dann ihrerseits die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 aktivieren kann (Muzio et al. 1998).

Beim intrinsischen Signalweg kommt den Mitochondrien eine zentrale Rolle zu. Reize wie Teratogene, oxidativer Stress oder DNA-Schäden können zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien führen. Cytochrom c bildet mit Caspase 9 und Apaf-1 das oben erwähnte Apoptosom. In diesem Komplex ist Caspase 9 aktiv und kann wiederum die Effektorcaspasen aktivieren. Ausführliche Übersichtsartikel zu diesem Thema finden sich z. B. bei Hengartner (2000), Mirkes (2002), Danial & Korsmeyer (2004), Fischer & Schulze-Osthoff (2005) sowie Elmore (2007).

In den letzten Jahren wurden verschiedene Untersuchungen veröffentlicht, die für eine Bedeutung der Apoptose von Kardiomyozyten bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz sprechen. Einige Studien an Gewebeproben aus menschlichen insuffizienten Herzen zeigten Anzeichen für Apoptose (wie gesteigerte DNA-

Fragmentierung oder gesteigerte Caspase 3-Aktivität), aber auch antiapoptotische (möglicherweise kompensatorische) Veränderungen, wie einen Anstieg von Bcl-2. Auch in tierexperimentellen Ansätzen zur Auslösung eines Herzversagens (wie Ischämie/Reperfusion oder Drucküberlastung) zeigte sich eine gesteigerte Apoptose von Kardiomyozyten (Übersichten bei Kang & Izumo 2000, Kang & Izumo 2003, van Empel et al. 2005, Regula & Kirshenbaum 2005, Narula et al. 2006, Kunapuli et al. 2006). Hinweise auf eine Beteiligung cAMP-abhängiger Signaltransduktionswege bei der Auslösung kardiomyozytärer Apoptose ergaben sich durch das Modell einer Maus, die die α -Untereinheit des stimulierenden GTP-bindenden Proteins G_s , also des vom β -Adrenozeptor aktivierten GTP-bindenden Proteins, überexprimiert. Mäuse aus dieser Linie zeigen in höherem Alter eine verstärkte myokardiale Apoptose sowie eine beeinträchtigte Herzfunktion, während eine mehrmonatige Behandlung mit dem β -Adrenozeptorantagonisten Propranolol der Verschlechterung der Herzfunktion sowie der Ausbildung der myokardialen Apoptose vorbeugt (Geng et al. 1999, Asai et al. 1999).

1.3 Der Transkriptionsfaktor AP-2 α

Der Transkriptionsfaktor AP-2 α (Activator Protein 2 α) gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die von homologen Genen kodiert werden, und von denen bisher fünf bekannt sind: AP-2 α (Mitchell et al. 1987, Imagawa et al. 1987), AP-2 β (Buettner et al. 1994), AP-2 γ (Oulad-Abdelghani et al. 1996, zunächst als AP-2.2 bezeichnet), AP-2 δ (Zhao et al. 2001) und AP-2 ϵ (Feng & Williams 2003). Die Transkriptionsfaktoren dieser Familie zeigen eine ähnliche Struktur mit einem C-terminalen „helix-span-helix“-Dimerisationsmotiv, einem davor liegenden basenreichen DNA-Bindungsmotiv und einer prolin- und glutaminreichen Transaktivierungsdomäne im N-Terminus (Williams & Tjian 1991a und b). Allen AP-2-Transkriptionsfaktoren ist gemeinsam, dass sie Dimere bilden und dann bevorzugt an die palindromische Sequenz 5'-GCCNNGGC-3' binden (Mohibullah et al. 1999), allerdings sind auch andere GC-reiche Bindungssequenzen beschrieben, zum Beispiel 5'-CCCCAGGC-3' (Mitchell et al. 1987). Bleibt die Dimerisation aus, kann AP-2 nicht an die DNA binden. Von

AP-2 α ist eine als AP-2 α B bezeichnete Spleißvariante bekannt, der das Dimerisationsmotiv und Teile des DNA-Bindungsmotivs fehlen, und die deswegen als Repressor von AP-2 wirkt (Buettner et al. 1993).

Die Aktivität der AP-2-Transkriptionsfaktoren kann über mehrere Signalwege und Mechanismen reguliert werden. So kann, neben Phorbolestern (über einen Proteinkinase C-abhängigen Weg), unter anderem ein erhöhter cAMP-Spiegel die Expression von AP-2 steigern (Imagawa et al. 1987). Unklar ist die funktionelle Bedeutung einer durch die Proteinkinase A katalysierten Phosphorylierung am Serin 239, die möglicherweise eine Aktivitätssteigerung von AP-2 bewirkt (García et al. 1999).

AP-2-Bindungsmotive wurden u. a. in den Promotoren des kardialen Troponin T der Ratte (Wang et al. 1994), des menschlichen Wachstumshormons (Imagawa et al. 1987) und der α -Untereinheit des menschlichen G_{i2}-Proteins (Weinstein et al. 1988) identifiziert; sowie in den Promotoren weiterer Gene, die an Vorgängen wie Zellproliferation, Zell(ent)differenzierung, Zellzykluskontrolle und Apoptose beteiligt sind (Übersicht bei Hilger-Eversheim et al. 2000). AP-2 kann dabei je nach Zelltyp und Differenzierungsstatus sowohl pro- als auch antiproliferativ wirken. So induziert AP-2 (AP-2 α und AP-2 γ dreimal stärker als AP-2 β) in menschlichen Brustkrebszelllinien das Protoonkogen c-erbB-2, was zu einem hormonunabhängig wachsenden, besonders aggressiven Tumortyp führt (Bosher et al. 1995). In Zellen aus menschlichen malignen Melanomen hingegen führt eine Abnahme von AP-2 zur Herunterregulierung der Antionkogene MCAM/MUC18 (ein Zelladhäsionsmolekül) und c-KIT (ein Tyrosinkinasegekoppelter Rezeptor), was ein besonders invasives Wachstum der Tumorzellen bewirkt (Huang et al. 1998).

Trotz ihrer großen Homologie scheinen die von verschiedenen Genen kodierten AP-2-Isoformen ganz unterschiedliche Funktionen vor allem während der Embryogenese zu besitzen, was anhand von Knockout-Modellen für AP-2 α , AP-2 β und AP-2 γ deutlich wurde. Homozygote *Ap-2 α* -Knockoutmäuse zeigen schon während der Embryonalentwicklung schwere Defekte wie Anenzephalie, kraniofaziale Missbildungen und thorakoabdominale Spaltbildung; sie sind nicht lebensfähig und sterben während der Geburt (Schorle et al. 1996, Zhang et al.

1996). Ganz anders dagegen zeigt sich der Phänotyp eines homozygoten Knockouts von *Ap-2 β* . Bei diesen Mäusen zeigt sich eine normale craniofaciale Entwicklung, jedoch findet man bei diesen Tieren schon während der Embryonalphase eine verstärkte Apoptose von Nierentubulusepithelien, so dass sich die Nieren polyzystisch verändern. Die Tiere überleben höchstens zwei Wochen nach Geburt, sind stark wachstumsretardiert und sterben im Nierenversagen (Moser et al. 1997). Mäuse mit einem homozygoten Knockout von *Ap-2 γ* sterben schon während der frühen Embryonalphase. Bei ihnen ist die Bildung des trophoblastischen Blastozystenanteils gestört, so dass die Embryonen während der Implantationsphase absterben (Auman et al. 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass AP-2 α im menschlichen Myokard exprimiert wird. Es zeigte sich ein auf mehr als 200% angestiegener AP-2 α -Spiegel in Proben aus insuffizienten Herzen im Vergleich mit Proben aus nicht insuffizienten Herzen (Müller et al. 2004). Wurde AP-2 α adenovirusvermittelt in neonatalen Rattenkardiomyozyten überexprimiert, löste dieses in den infizierten Rattenkardiomyozyten Apoptose aus (Müller et al. 2004).

1.4 Der Transkriptionsfaktor CREM

Der Transkriptionsfaktor CREM (cAMP Response Element Modulator) gehört zu einer Familie cAMP-abhängiger Transkriptionsfaktoren, zu der neben CREM (Foulkes et al. 1991) auch das cAMP Response Element Binding Protein (CREB) (Hoeffler et al. 1988) und der Activating Transcription Factor 1 (ATF1) (Hai et al. 1989) gehören. Die Transkriptionsfaktoren dieser Familie werden auch unter dem Oberbegriff CREB-ähnliche Transkriptionsfaktoren zusammengefasst. Ihnen gemeinsam ist die gleiche Grundstruktur (Brindle et al. 1993, de Groot et al. 1993, Quinn 1993): C-terminal findet sich ein „leucin-zipper“-Dimerisierungsmotiv, in dem in regelmäßigem Abstand Leucinreste vorhanden sind, die bei der Dimerisierung wie ein Reißverschluss in hydrophobe Wechselwirkung treten können (Übersicht in Löffler 1998). Vor dem Dimerisierungsmotiv finden sich ein basisches DNA-Bindungsmotiv und, je nach Isoform, eine zentral gelegene Kinase-induzierbare Domäne (KID), die von ein oder zwei gluta-

minreichen hydrophoben Aktivator-domänen flankiert wird. Die KID enthält Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase A sowie für andere Kinasen.

Die CREB-ähnlichen Transkriptionsfaktoren können untereinander Homo- oder Heterodimere bilden und binden dann an die palindromische Sequenz 5'-TGACGTCA-3', die typischerweise nicht mehr als 100 Nukleotide von der TATA-Box entfernt ist (Montminy et al. 1986, Comb et al. 1986, Short et al. 1986). Neben dieser palindromischen Sequenz enthalten einige Genpromotoren auch die nichtpalindromische Sequenz 5'-CGTCA-3', die jedoch weniger affin ist als die volle palindromische Sequenz (Yamamoto et al. 1988, Fink et al. 1988, Craig et al. 2001). Die Bindungsstelle dieser cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktoren in Genpromotoren wird als CRE (cAMP Response Element) bezeichnet.

Die Aktivität der CREB-ähnlichen Transkriptionsfaktoren wird vor allem durch den Phosphorylierungszustand innerhalb der KID bestimmt. Nach Phosphorylierung an einem bestimmten Serin (Ser133 bei CREB) wird der Co-Aktivatort CBP (CREB Binding Protein) gebunden (Chrivia et al. 1993, Arias et al. 1994, Kwok et al. 1994, Parker et al. 1996), und dieser Komplex aktiviert die Transkription. Dabei kann CBP als Histonacetyltransferase wirken, wodurch die Chromatinstruktur verändert und die Bindung des Transkriptionsapparates an die DNA erleichtert wird (Bannister und Kouzarides 1996, Ogryzko et al. 1996). Die Gene für CREM und CREB kodieren für mehrere, durch alternatives Spleißen entstehende mRNAs, die wiederum zur Synthese verschiedener Proteine führen, die entweder als Aktivator, oder – wenn die Aktivator-domäne (KID) fehlt – als Repressor wirken können (Delmas et al. 1992, Walker et al. 1996). Diese nicht aktivierbaren Isoformen können untereinander oder mit aktivierenden Isoformen Dimere bilden und an die DNA binden, so dass sie in kompetitiver Weise aktivierende Isoformen von der DNA verdrängen. Auch ICER (Inducible cAMP Early Repressor) ist eine CREM-Isoform, der die Aktivator-domäne fehlt, und die deswegen einen potenten induzierbaren Transkriptionsrepressor darstellt (Molina et al. 1993).

Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung eines einzelnen Serins (Ser133 bei CREB, s. o.) durch die Proteinkinase A zur Aktivierung von CREB

ausreicht, während eine Mutation dieses Serins zum (nicht phosphorylierbaren) Alanin die Aktivierung von CREB durch die Proteinkinase A verhindert (Gonzalez & Montminy 1989). Neben der cAMP-abhängigen, durch die Proteinkinase A vermittelten Aktivierung können auch eine Reihe weiterer Signale wie Wachstumsfaktoren über verschiedene Kinasen zur Phosphorylierung und damit Aktivierung der CREB-ähnlichen Transkriptionsfaktoren führen, Übersichten dazu findet sich bei Mayr und Montminy (2001) sowie Carlezon et al. (2005). Auch eine vom Phosphorylierungszustand unabhängige Aktivitätsregulation über so genannte TORCs (Transducer Of Regulated CREB Activity Coactivators) ist beschrieben (Takemori et al. 2007).

CRE-Elemente finden sich in einer Vielzahl von Genen, die in Bereichen wie Metabolismus, Transkriptionskontrolle, Neurotransmission, Zellzykluskontrolle, Transport oder Zellstruktur eine Rolle spielen. Interessanterweise sind die Gene für CREB und CREM-ICER selbst durch CREs reguliert (Übersicht bei Mayr & Montminy 2001). Eine genomweite Suche nach Zielgenen von CREB wurde von Zhang et al. (2005) beschrieben, deren Ergebnisse auf der Internetseite dieser Arbeitsgruppe (<http://natural.salk.edu/CREB>) abrufbar sind.

Mehrere Arbeitsgruppen haben Tiermodelle etabliert, bei denen Transkriptionsfaktoren aus der CREB/CREM/ATF1-Familie auf unterschiedliche Weise in ihrer Aktivität verändert sind. Hierbei zeigten sich sehr unterschiedliche Phänotypen. Homozygote *Creb*-Knockoutmäuse mit einer Deletion des Dimerisationsmotivs sterben bei der Geburt an einer Lungenatelektase und haben schon in der Fetalphase eine gestörte Entwicklung der T-Zellreihen (Rudolph et al. 1998). Im Gegensatz dazu erreichen homozygote *Crem*-Knockoutmäuse das Erwachsenenalter, jedoch sind männliche *Crem*-Knockouttiere aufgrund einer verstärkten Apoptose von postmeiotischen Keimzellen steril (Nantel et al. 1996, Blendy et al. 1996a). Außerdem zeigen die Tiere ein verändertes Verhalten, unter anderem einen fehlenden zirkadianen Rhythmus und vermindertes Angstgefühl in Verhaltenstests (Maldonado et al. 1999).

Auch am Herzen konnte die Bedeutung der CREB-ähnlichen Transkriptionsfaktoren gezeigt werden. Sowohl CREB als auch CREM werden im menschlichen Herzen exprimiert (Müller et al. 1995, Müller et al. 1998), wobei sich jedoch die

Proteinexpression von CREB in insuffizientem Myokard nicht von der in gesundem Myokard unterscheidet (Müller et al. 1997). In verschiedenen Tiermodellen zeigte sich die Bedeutung der CREB-ähnlichen Transkriptionsfaktoren am Herzen. Mäuse, die eine dominant negative, nicht phosphorylierbare Mutante von CREB überexprimieren (CREB_{A133}), bei der das für die Aktivierung wichtige Serin an Position 133 durch Alanin ersetzt ist (s. o.), zeigen schon wenige Wochen nach der Geburt Zeichen der Herzinsuffizienz, die der menschlichen dilatativen Kardiomyopathie ähneln, und sterben auch an Herzversagen (Fentzke et al. 1998). Ein anderes Bild zeigte sich in Mäusen, die eine im menschlichen Herzen vorkommende CREM-Isoform, CREM-IbΔC-X, überexprimieren. Dieser Isoform fehlt die Kinase-induzierbare Domäne, so dass es sich auch bei dieser Isoform um eine dominant negative Isoform handelt (Müller et al. 1998). Mäuse aus dieser Linie zeigen keine exzentrische, sondern eine konzentrische Hypertrophie der Ventrikel, verbunden mit erhöhter Kontraktilität. Die Vorhöfe sind stark vergrößert, und die Mäuse sterben früh, wahrscheinlich aufgrund von von den Vorhöfen ausgehenden Arrhythmien (Müller et al. 2005). Die oben schon angesprochenen *Crem*-Knockoutmäuse zeigen keine morphologischen Veränderungen des Herzens, jedoch ist bei ihnen basal die Herzfunktion (gemessen als linksventrikulärer Druck, Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit) herabgesetzt, während die durch maximale β_1 -Stimulation erreichbare Herzfunktion im Vergleich zu Wildtypen nicht vermindert ist (Müller et al. 2003). Mäuse, bei denen *Creb* mittels des *Cre-loxP*-Systems gewebespezifisch in Kardiomyozyten ausgeschaltet wurde, zeigen hingegen keinerlei Veränderungen in Herzmorphologie und Herzfunktion, sowohl basal als auch unter maximaler adrenerger Stimulation; auch ist bei ihnen die Proteinexpression im Herzen sowie die basale Apoptoserate unverändert. Die Diskrepanz zum oben erwähnten Modell einer Überexpression der dominant negativen CREB-Isoform CREB_{A133} im Herzen ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass CREB_{A133} nicht nur die Aktivität von CREB, sondern auch von anderen Transkriptionsfaktoren aus der CREB/CREM/ATF1-Familie hemmt (Matus et al. 2007).

Dass CREB-ähnliche Transkriptionsfaktoren auch in die Regulation der kardiomyozytären Apoptose involviert sind, zeigte eine Studie, in der durch adenovi-

rusvermittelte Überexpression der dominant negativen CREM-Isoform ICER (s. o.) die durch Isoprenalin verursachte Hypertrophie von neonatalen Rattenkardiomyozyten abgeschwächt, aber gleichzeitig die Apoptose der Kardiomyozyten stimuliert wurde (Tomita et al. 2003).

1.5 Fragestellung, Ziele und Ergebnisse

Vorarbeiten belegen, dass sowohl der Transkriptionsfaktor AP-2 α als auch der Transkriptionsfaktor CREM in Kardiomyozyten proapoptotisch wirken. AP-2 α konnte in einem Modell adenovirusvermittelter Überexpression in Kardiomyozyten Apoptose auslösen (Müller et al. 2004), während die adenovirusvermittelte Überexpression der dominant negativen CREM-Isoform ICER in isoprenalinbehandelten Kardiomyozyten die Auslösung von Apoptose stimulieren konnte (Tomita et al. 2003). Es sollte daher die Hypothese untersucht werden, dass das Myokard von *Ap-2 α ^{-/+}*-Tieren und von *Crem*-Knockouttieren (denen durch die Inaktivierung des *Crem*-Genes auch die dominant negativen Isoformen wie ICER fehlen) weniger empfindlich auf Apoptosereize reagiert als das Myokard von Wildtyp-Vergleichstieren.

Ziel der Arbeit war es, mit Hilfe eines Ischämie/Reperusionsmodells in Langendorff-perfundierten Herzen von *Ap-2 α ^{-/+}*-Mäusen und *Crem*-Knockoutmäusen Apoptose auszulösen und diese zu quantifizieren. Dazu wurden heterozygote *Ap-2 α ^{-/+}*-Mäuse (homozygote *Ap-2 α ^{-/-}*-Mäuse sterben aufgrund schwerer Missbildungen während der Geburt, s. o.) und homozygote *Crem^{-/-}*-Mäuse mit Wildtyptieren aus der entsprechenden Linie verglichen.

Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit stellt der Befund dar, dass sowohl in Herzen von *Ap-2 α ^{-/+}*-Tieren als auch in Herzen von *Crem^{-/-}*-Tieren die durch Ischämie und Reperfusion ausgelöste Apoptose im Vergleich mit Herzen entsprechender Wildtyptiere nicht verändert ist.

2 Material und Methoden

2.1 Tierlinien

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden in Übereinstimmung mit vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigten Protokollen durchgeführt.

2.1.1 *Ap-2 α ^{-/+}*-Tiere

Die in diesen Experimenten eingesetzte Tierlinie wurde 1996 erstmals beschrieben (Schorle et al. 1996). Das Exon 5 des *Ap-2 α* -Gens wurde durch ein Gen für Neomycin-Resistenz (*neo*) ersetzt. Da das Exon 5 einen Teil der DNA-Bindungs- und Dimerisations-Domäne von AP-2 α kodiert, resultierte eine funktionelle Inaktivierung von AP-2 α .

Homozygot AP-2 α -defiziente Tiere sind nicht lebensfähig. Für alle Experimente wurden heterozygote Tiere (*Ap-2 α ^{-/+}*) eingesetzt.

Tiere aus dieser Linie wurden uns freundlicherweise von Prof. H. Schorle (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn) zur Verfügung gestellt.

2.1.2 *Crem^{-/-}*-Tiere

Die hier eingesetzten CREM-defizienten Mäuse wurden 1996 beschrieben (Blendy et al. 1996a).

Kurz gefasst wurden die Exons Ia und Ib des *Crem*-Gens durch ein Fusionskonstrukt aus dem Gen für die β -Galaktosidase (*LacZ*) und dem Gen für die Neomycin-Resistenz (*neo*) ersetzt. Da die Exons Ia/Ib die für die Dimerisierung und DNA-Bindung essentiellen Leuzin-Zipper-Domänen des CREM-Proteins kodieren, führte die Ausschaltung der Exons Ia/Ib zu einer funktionellen Inaktivierung von CREM.

Tiere aus dieser Linie wurden uns freundlicherweise von Prof. G. Schütz (Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

2.2 Langendorff-Perfusion

2.2.1 Beschreibung des Verfahrens

Beim von Langendorff (1895) erstmals beschriebenen Verfahren werden isolierte Herzen für eine begrenzte Zeit extrakorporal – also *in-vitro* – vital erhalten. Dieses geschieht, indem die Aorta ascendens an eine Kanüle passender Größe angeschlossen und das Herz mit einem Druck von ca. 80 mmHg retrograd perfundiert wird. Dabei bleibt die Aortenklappe geschlossen, und der linke Ventrikel wird nicht gefüllt, so dass das Perfusat durch die Koronararterien fließt.

Als Perfusat diente ein modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer (Krebs & Henseleit 1932), der mit einem Gemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlenstoffdioxid begast und auf 37 °C erwärmt wurde.

2.2.2 Präparation der Herzen

Nach Tötung des Versuchstieres durch Injektion von Urethane erfolgten Thoraotomie und Entnahme des Herzens zusammen mit dem Aortenbogen. Das entnommene Herz wurde für wenige Sekunden in raumtemperiertem heparinisierten Perfusionspuffer gespült, um in den Herzkammern verbliebenes Blut zu entfernen. Die weitere Präparation des Herzens erfolgte in 4 °C kaltem ebenfalls heparinisierten Perfusionspuffer. Dabei wurde der Aortenbogen dargestellt und an eine 18 Gauge-Kanüle angeschlossen. Mit Hilfe einer Spritze wurde das Herz retrograd perfundiert, um die Dichtigkeit der Verbindung zu prüfen und restliches Blut aus den Koronargefäßen zu spülen. Danach erfolgte der Anschluss an die Perfusionsapparatur.

2.2.3 Ablauf des Versuchs

Nach Anschluss an die Perfusionsapparatur wurden die Herzen zunächst während 30 min perfundiert, um eine Äquilibration zu erreichen. Herzen, die nach dieser Phase nicht, bradykard oder arrhythmisch kontrahierten, wurden nicht weiter untersucht.

Nach der Äquilibrationsphase folgte eine Phase der normothermischen Globalischämie. Dazu wurde der Fluss durch die Aorta unterbrochen. Während der Ischämiezeit wurde das Herz jedoch von außen mit Perfusionspuffer umspült,

um eine Abkühlung des Gewebes sowie eine Nekroseentwicklung durch Austrocknung zu verhindern.

Nach der jeweils angegebenen Ischämiezeit wurde der Fluss durch die Aorta wieder freigegeben, um das Herz für die vom Versuchsprotokoll vorgesehene Zeit zu reperfundieren. Setzte nicht nach spätestens 5 min wieder eine Eigenkontraktion des Herzens ein, wurde der Versuch abgebrochen, nicht jedoch beim Auftreten von Arrhythmien.

Am Versuchsende wurden die Ventrikel in der Klappenebene von Vorhöfen und Gefäßen abgetrennt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.2.4 Verwendete Lösungen

2.2.4.1 Urethane-Injektionslösung

0,4 mg/μl Urethane (Katalog-Nr. U2500, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 0,9% (m/V) NaCl in wässriger Lösung

2.2.4.2 Perfusionspuffer (modifiziert nach Krebs & Henseleit)

118 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 0,5 mM EDTA, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 2,5 mM CaCl₂, 11 mM Glucose, pH 7,4 bei Begasung mit einem Gemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂

2.3 Nachweis von DNA-Fragmentierung

2.3.1 DNA-Gewinnung

Das in den Perfusionsversuchen (siehe 2.2) gewonnene Ventrikelgewebe wurde zunächst pulverisiert. Dazu wurde das Gewebe in einem mit Flüssigstickstoff gefüllten Metalltiegel schockgefroren und mit einem ebenfalls vorgekühlten Metallmörser zerschlagen. 15 bis 20 mg des Gewebepulvers wurden in einem Reaktionsgefäß mit 250 μl Lysepuffer und 12,5 μl Proteinase K-Lösung versetzt und unter Schütteln bei 55 °C über Nacht inkubiert.

Nach vollständiger Proteolyse wurde die DNA gereinigt. Dazu wurden in einem ersten Schritt 250 μl Phenol zugegeben, beide Phasen durch Schütteln gut durchmischt und durch 5-minütiges Zentrifugieren in einer Tischzentrifuge mit

13000 min⁻¹ wieder getrennt. Anschließend wurde die obere (wässrige) Phase unter Zurücklassen der Zwischenphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde in einem zweiten Schritt mit 125 µl Phenol und 125 µl eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) und in einem dritten Schritt mit 250 µl des Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches wiederholt. Um die DNA auszufällen, wurden 25 µl einer Natriumacetatlösung (3 M, pH 6,0) und 500 µl auf -20 °C gekühltes Ethanol zugegeben, bevor der Ansatz bei -20 °C über Nacht gelagert wurde.

Am nächsten Tag wurde die ausgefällte DNA durch 15-minütiges Zentrifugieren mit 13000 min⁻¹ bei 4 °C zu einem Pellet verdichtet und der Flüssigkeitsüberstand abgegossen. Das Pellet wurde mit 500 µl einer 70-prozentigen Ethanollösung (V/V) gewaschen, bei 55 °C getrocknet, bis kein sichtbarer Flüssigkeitsrest mehr vorhanden war, und in 50 µl TE-Puffer gelöst.

Abschließend wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

2.3.2 Gelelektrophorese

Die unter 2.3.1 beschriebenen DNA-Proben wurden auf eine konstante Konzentration von 5 µg DNA pro 15 µl TE-Puffer verdünnt. Eventuell verbliebene RNA-Reste wurden durch Verdau mit DNase-freier RNase (2 ng/µl) für 30 min bei 37 °C entfernt. Vor dem Beladen des Gels wurden jeder Probe 1,5 µl farbloser Ladepuffer zugesetzt.

Die DNA-Elektrophorese erfolgte auf einem Agarosegel (1,5% (m/V) Agarose in TAE-Puffer), dem 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt worden war, bei einer konstanten Spannung von 50 V. Als Größenstandard dienten 0,3 µg eines nach Herstellervorschrift vorbereiteten DNA-Standards.

Nach Auftrennung der DNA wurde das Ergebnis durch Digitalphotographie dokumentiert. Hierbei diente die unter UV-Beleuchtung auftretende Fluoreszenz des an die DNA gebundenen Ethidiumbromids zur Visualisierung der DNA.

2.3.3 Auswertung

Um das Ausmaß der DNA-Fragmentierung und damit das Ausmaß der in der ursprünglichen Gewebeprobe vorliegenden Apoptose zu quantifizieren, wurde

mit Hilfe der Software „ImageQuant 5.0“ (GE Healthcare, Piscataway, USA) die Dichte der 180-Basenpaar-Bande (abzüglich des Hintergrundes) bestimmt.

Die Werte aus verschiedenen Versuchsgruppen wurden mittels ANOVA und Post-Hoc-Test nach Holm-Sidak verglichen; ein signifikanter Unterschied wurde angenommen, wenn die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler erster Art kleiner als 5% war („ $p < 0,05$ “).

2.3.4 Verwendete Lösungen und Standards

2.3.4.1 Lysepuffer

50 mM TRIS, 100 mM EDTA, 5 mg/ml SDS in wässriger Lösung

2.3.4.2 Proteinase K-Lösung

Proteinase K (Katalog-Nr. P2308, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 10 mg/ml in wässriger Lösung

2.3.4.3 Phenol

Phenol, gepuffert (Roti-Phenol, Katalog-Nr. 0038.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

2.3.4.4 Chloroform/Isoamylalkohol

Chloroform/Isoamylalkohol 24:1 (V/V)

2.3.4.5 Natriumacetat pH 6,0

3 M Natriumacetat in wässriger Lösung, pH wird mit konz. Salzsäure auf 6,0 eingestellt.

2.3.4.6 TE-Puffer

10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA in wässriger Lösung

2.3.4.7 TAE-Puffer

40 mM TRIS, 20 mM Eisessig, 2 mM EDTA in wässriger Lösung

2.3.4.8 RNase, DNase-frei

RNase, DNase-free, Katalog-Nr. 11 119 915 001, Roche Applied Science, Indianapolis, USA

2.3.4.9 Ethidiumbromid-Lösung

Ethidiumbromid 1% (m/V) in wässriger Lösung, Katalog-Nr. 1.11608, Merck, Darmstadt, Deutschland

2.3.4.10 Ladepuffer farblos

40 mM TRIS, 20 mM Eisessig, 2 mM EDTA, 50% (V/V) Glycerin in wässriger Lösung

2.3.4.11 DNA-Standard

GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Katalog-Nr. SM0241, Fermentas, Hanover, USA

2.4 Western Blots

2.4.1 Gewebeaufarbeitung

Ventrikelgewebe aus den Langendorff-Perfusionsversuchen wurde schockgefroren und zu Pulver zerschlagen (siehe 2.3.1). 15 bis 20 mg dieses Gewebepulvers wurden mit 10 µl Homogenatpuffer pro mg Gewebe in ein auf -180 °C abgekühltes Keramikgefäß gefüllt und im Dismembrator U (Sartorius Stedim, Aubagne, Frankreich) für 1,5 min bei 1800 min^{-1} weiter homogenisiert. Das entstandene Pulver wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C im Kühlschrank aufgetaut. Die entstandene Gewebesuspension wurde für 1 s mit Ultraschall behandelt (VirSonic 60, Virtis, Gardiner, USA), um noch verbliebene Zellkompartimente zu eröffnen. Anschließend wurde die Suspension in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (4 min bei 2000 min^{-1}) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Die Konzentration des Gesamtproteins in der entstandenen Lösung wurde mit dem Verfahren nach Bradford bestimmt (Bradford 1976).

2.4.2 Gelelektrophorese und Blot

Die unter 2.4.1 beschriebenen Proteinproben wurden so mit Homogenatpuffer verdünnt, dass die gewünschte Proteinmenge in 15 µl Puffer gelöst war. Nach Zugabe von 15 µl 2x-Probenpuffer (Laemmli) wurden die Proben für 1 min auf 95 °C erhitzt und wieder auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die Elektrophorese erfolgte auf einem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel (4,5-prozentiges Sammelgel und 15-prozentiges Trenngel) in einer „Mini-PROTEAN 3“-Gelkammer (Bio-Rad, Hercules, USA) bei einer konstanten Spannung von 140 V.

Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine bei einer konstanten Spannung von 30 V für 16 h auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde anschließend bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

2.4.3 Immunologischer Nachweis von gespaltenem Lamin A und Calsequestrin

Die Membran wurde mit Methanol befeuchtet und für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln mit Blockierpuffer inkubiert. Danach folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (1:1000 in Antikörperpuffer) bei 4 °C über Nacht. Nachdem der erste Antikörper 4 x 10 min mit Waschpuffer abgewaschen worden war, wurde die Membran unter leichtem Schütteln für 1 h bei Raumtemperatur mit dem HRP-konjugierten zweiten Antikörper (1:5000 in Antikörperpuffer) inkubiert. Nach erneutem Waschen für 4 x 10 min mit Waschpuffer wurde die Membran nach Herstellervorschrift mit ECL-Reagenz inkubiert und für 1 min, 8 min und 60 min auf Röntgenfilm (Hyperfilm MP, GE Healthcare, Piscataway, USA) aufgelegt. Abschließend wurde die Membran für 1 h mit destilliertem Wasser gewaschen, um überschüssiges ECL-Reagenz zu inaktivieren, und erneut luftgetrocknet.

2.4.4 Auswertung

Die belichteten und fixierten Röntgenfilme wurden mittels eines Flachbettscanners digitalisiert. Die Dichte der Proteinbande (gespaltenes Lamin A bzw. Calsequestrin) wurde mit Hilfe der Software „ImageQuant 5.0“ (GE Healthcare,

Piscataway, USA) quantifiziert. Die Dichte der Calsequestrinbande diente als Beladungskontrolle, und Lamin A wurde darauf bezogen.

Die Werte aus verschiedenen Versuchsgruppen wurden mittels ANOVA und Post-Hoc-Test nach Holm-Sidak verglichen, ein signifikanter Unterschied wurde angenommen, wenn die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler erster Art kleiner als 5% war („ $p < 0,05$ “).

2.4.5 Verwendete Lösungen und Chemikalien

2.4.5.1 Homogenisierungspuffer

50 mM TRIS, 250 mM NaCl, 0,5% (V/V) Nonidet P-40, 10% (V/V) Glycerin, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 0,5 mM Na_3VO_4 , 10 mM β -Glycerophosphat, 0,5 mM PMSF, 5 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 5 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin in wässriger Lösung, pH wurde mit konz. Salzsäure auf 7,4 eingestellt

2.4.5.2 Bradford-Reagenz

Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Katalog-Nr. 500-0006, Bio-Rad, Hercules, USA

2.4.5.3 2x-SDS-Probenpuffer (Lämmli)

125 mM TRIS, 4% (m/V) SDS, 20% (V/V) Glycerin, 200 mM DTT, 0,02% (m/V) Bromphenolblau in wässriger Lösung, pH wurde mit konz. Salzsäure auf 6,8 eingestellt

2.4.5.4 SDS-Polyacrylamid-Trenngel 15%

15% (m/V) Acrylamid, 0,4% (m/V) Bisacrylamid, 375 mM TRIS, 0,1% (m/V) SDS in wässriger Lösung, pH wurde mit konz. Salzsäure auf 8,8 eingestellt, die Polymerisation wurde ausgelöst durch Zugabe von 0,05% (m/V) Ammoniumpersulphat und 0,03375% (V/V) TEMED

2.4.5.5 SDS-Polyacrylamid-Sammelgel 4,5%

4,5% (m/V) Acrylamid, 0,12% (m/V) Bisacrylamid, 125 mM TRIS, 0,1% (m/V) SDS in wässriger Lösung, pH wurde mit konz. Salzsäure auf 6,8 eingestellt, die

Polymerisation wurde ausgelöst durch Zugabe von 0,05% (m/V) Ammoniumpersulphat und 0,05% (V/V) TEMED

2.4.5.6 Elektrophoresepuffer

25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0,1% (m/V) SDS in wässriger Lösung

2.4.5.7 Transferpuffer

25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 20% (V/V) Methanol in wässriger Lösung

2.4.5.8 PBS

8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na₂HPO₄, 0,24 g/l KH₂PO₄ in wässriger Lösung, pH wurde mit konz. Salzsäure auf 7,4 eingestellt

2.4.5.9 Blockierpuffer

5% (m/V) Magermilchpulver in PBS

2.4.5.10 Antikörperpuffer

0,5% (m/V) Magermilchpulver in PBS

2.4.5.11 Waschpuffer

0,5% (m/V) Magermilchpulver, 0,05% (V/V) Tween 20 in PBS

2.4.5.12 Lamin A-Antikörper

Katalog-Nr. 2031 von Cell Signaling Technology, Beverly, USA

2.4.5.13 Calsequestrin-Antikörper

Dieser Antikörper wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. L. R. Jones, Indianapolis, USA.

2.4.5.14 HRP-konjugierter Anti-Rabbit-IgG-Antikörper

Katalog-Nr. PI-1000 von Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.4.5.15 ECL-Reagenz

ECL Western Blotting Detection Reagents, Katalog-Nr. RPN2109, GE Healthcare, Piscataway, USA

2.5 Caspase 3/7-Assay

2.5.1 Gewebeaufarbeitung

Ventrikelgewebe aus den Langendorff-Perfusionsversuchen wurde zunächst schockgefroren und zu Pulver zerschlagen (siehe 2.3.1). Etwa 5 mg dieses Gewebepulvers wurden mit 40 μ l Homogenisierungspuffer pro mg Gewebe analog dem in 2.4.1 beschriebenen Verfahren weiter aufgearbeitet. Zuletzt wurde die Proteinkonzentration nach Bradford (1976) bestimmt.

2.5.2 Messung der Caspase 3/7-Aktivität

Die Messung der Caspase 3/7-Aktivität wurde mit einem kommerziell erhältlichen Kit (Caspase-Glo-Assay, Promega, Madison, USA) durchgeführt. Direkt vor der Messung der Caspaseaktivität wurden 4 μ l des Gewebehomogenates (siehe 2.5.1) mit 16 μ l Homogenatspuffer verdünnt. Caspase-Glo-Lösung wurde nach Herstellerangabe vorbereitet. Jeweils 10 μ l des verdünnten Homogenats wurden in Reaktionsgefäßen mit 10 μ l Caspase-Glo-Lösung vermischt und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Caspase 3/7-Aktivität in den Proben wurde nach 90, 120 und 150 Minuten luminometrisch bestimmt (Lumat LB 9501, Berthold, Bad Wildbad, Deutschland). Dieses geschah, indem ein im Caspase-Glo-Kit enthaltenes proluminogenes, die Tetrapeptidsequenz DEVD enthaltendes Substrat durch die in der Probe enthaltene Caspase 3 und Caspase 7 gespalten wurde. Dadurch entstand ein Substrat, das durch die ebenfalls im Kit enthaltene Luciferase unter Lumineszenz gespalten wurde.

2.5.3 Auswertung

Die drei Messwerte jeder Probe wurden gemittelt. Da sich die Proteinkonzentrationen der Proben unterschieden, wurden die Messwerte für die Caspase 3/7-Aktivität auf die jeweilige Proteinkonzentration bezogen.

Die Werte aus verschiedenen Versuchsgruppen wurden mittels ANOVA und Post-Hoc-Test nach Holm-Sidak verglichen, ein signifikanter Unterschied wurde angenommen, wenn die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler erster Art kleiner als 5% war („ $p < 0,05$ “).

2.5.4 Verwendete Lösungen und Chemikalien

2.5.4.1 Homogenatpuffer

80 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 0,2 mM EGTA, 0,5% (V/V) Nonidet P-40, 20 mM HEPES, 1 mM PMSF in wässriger Lösung, pH 7,4

2.5.4.2 Caspase-Glo-Assay

Katalog-Nr. G8090 von Promega, Madison, USA

3 Ergebnisse

3.1 Validierung der verwendeten Methoden

Vor Beginn der eigentlichen Datenerhebung wurden zunächst Vorexperimente durchgeführt, um die verwendeten Nachweismethoden für Apoptose im Hinblick auf ihre Aussagekraft im vorliegenden experimentellen Modell zu untersuchen.

3.1.1 Abhängigkeit der DNA-Fragmentierung von der Ischämiedauer

Herzen von Wildtyp-Mäusen wurden im Langendorff-Modus retrograd perfundiert. Dabei wurde ein Ischämie-Reperfusionsschaden ausgelöst, indem der Perfusatfluss für 40, 50 bzw. 60 Minuten unterbrochen wurde, bevor eine Reperfusion für 4 h durchgeführt wurde. DNA aus dem Ventrikelgewebe dieser Herzen wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt, auf einem 1,5-prozentigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf das Vorliegen einer DNA-Fragmentierung („DNA-Leiter“) untersucht. In allen diesen Proben zeigte sich eine typische „DNA-Leiter“, d. h. das Auftreten von DNA-Fragmenten, die Vielfache von 180 bp lang sind. Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Dauer der Ischämiephase und der Menge von fragmentierter DNA, gemessen als Dichte der 180 bp-Bande in der Gelelektrophorese (Abbildungen 1 und 2).

3.1.2 Positivproben für den Lamin A-Antikörper

Als Positiv- bzw. Negativproben dienten Proteinextrakte aus HUVEC-Zellen, die freundlicherweise von Solveig Söding aus der Arbeitsgruppe von Prof. B. Levkau (ehemals Institut für Arterioskleroseforschung an der Universität Münster) zur Verfügung gestellt wurden. Diese Zellen waren wie bereits in der Literatur beschrieben (Levkau et al. 1998) kultiviert worden; die Induktion von Apoptose erfolgte durch Entzug von Wachstumsfaktoren. 25 µg Protein wurden auf einem 15-prozentigen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit dem Antikörper gegen gespaltenes Lamin A inkubiert, die Visualisierung erfolgte mit Chemolumineszenz (ECL). Nur in Proben aus Zellen, in denen durch Wachstumsfaktorentzug Apoptose ausgelöst worden war, wurde in der erwarteten Höhe von etwa 45 kDa eine Doppelbande detektiert, nicht jedoch in der Probe aus den unbe-

handelten Zellen. Dabei zeigte sich auch eine Abhängigkeit der Bandenstärke von der Dauer des Wachstumsfaktorentzuges (Abbildung 3).

3.1.3 Abhängigkeit der Caspase 3/7-Aktivität von der Ischämiedauer

Herzen von Wildtyp-Mäusen wurden im Langendorff-Modus retrograd perfundiert. Teilweise erfolgte die Auslösung eines Ischämie-Reperfusionsschadens durch Unterbrechung des Perfusatflusses für 30, 40, bzw. 60 Minuten und eine Reperfusion von 90 bzw. 240 Minuten. Andere Herzen wurden lediglich perfundiert, eine Ischämiephase fand nicht statt. Ventrikelgewebe dieser Herzen wurde aufgearbeitet, und die Caspase 3/7-Aktivität wurde luminometrisch bestimmt. Bei den Herzen, die eine 60-minütige Ischämiephase und eine 240-minütige Reperusionsphase durchlaufen hatten, zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Caspase 3/7-Aktivität im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen (Abbildung 4).

3.2 Untersuchungen an der $Ap-2\alpha^{-/+}$ -Linie

In den Versuchen mit dieser Mäuselinie wurden Herzen von männlichen und weiblichen $Ap-2\alpha^{-/+}$ -Tieren im Alter von 26 bis 63 Wochen verwendet, da Tiere, bei denen das Gen homozygot ausgeschaltet wurde, nicht lebensfähig sind. Als Vergleich dienten männliche und weibliche Wildtyptiere des gleichen Alters aus der gleichen Linie.

Herzen dieser Tiere wurden im Langendorff-Modus retrograd perfundiert. Nach einer 30-minütigen Äquilibrationsphase folgten eine 60-minütige Ischämiephase sowie eine 4-stündige Reperusionsphase. Dieses experimentelle Protokoll hatte sich in den Vorexperimenten (s. 3.1) als geeignet erwiesen, da hier ein signifikanter Anstieg der Caspase 3/7-Aktivität gemessen werden konnte (s. Abbildung 4). Als nicht ischämische Kontrolle dienten Herzen, die 30 Minuten im Langendorff-Modus perfundiert wurden, ohne den Perfusatfluss zu unterbrechen. Auch hier wurden Herzen von $Ap-2\alpha^{-/+}$ -Tieren und von Wildtyptieren verwendet.

3.2.1 Apoptosenachweis durch DNA-Fragmentierung

Aus dem Ventrikelgewebe der perfundierten Herzen wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion DNA aufgereinigt und auf einem 1,5-prozentigen Agarosegel elektrophoretisch getrennt. In allen DNA-Proben von Herzen, bei denen ein Ischämie-Reperfusionsschaden ausgelöst worden war, fand sich das typische Bild der „DNA-Leiter“, d. h. DNA-Fragmente, die Vielfache von 180 Basenpaaren lang sind; hingegen konnte bei keiner DNA-Probe aus Kontrollherzen ohne Ischämie diese „DNA-Leiter“ gesehen werden (Abbildung 5).

Um die Stärke der DNA-Fragmentierung quantitativ auswerten zu können, wurde jeweils die Dichte der 180-Basenpaar-Bande bestimmt. Dabei zeigte sich sowohl bei den Wildtyptieren als auch bei den $Ap-2\alpha^{-/+}$ -Tieren ein signifikanter Anstieg dieser Dichte bei den Herzen nach Ischämie im Vergleich zu Kontrollbedingungen ($p < 0,05$). Es zeigte sich jedoch weder bei den Herzen nach Ischämie noch unter Kontrollbedingungen ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und $Ap-2\alpha^{-/+}$ (Abbildung 6).

3.2.2 Apoptosenachweis mittels Western Blot

Jeweils 100 µg Protein aus dem Ventrikelgewebe der perfundierten Herzen wurde auf einem 15-prozentigen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Diese Membran wurde dann mit Antikörper gegen gespaltenes Lamin A inkubiert und der gebundene Antikörper mittels eines peroxidasemarkierten Zweitantikörpers und Chemolumineszenz (ECL) visualisiert. Zur Beladungskontrolle wurde die Membran ebenfalls mit einem Antikörper gegen Calsequestrin inkubiert, die Visualisierung erfolgte analog.

In allen Proben wurde in der erwarteten Höhe ein Signal detektiert (Abbildung 7). Zur Quantifizierung wurde die Dichte dieses Signals bestimmt und, um Beladungsunterschiede auszugleichen, auf die Dichte des Calsequestrinsignals bezogen. Es ergaben sich dabei allerdings keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen, weder zwischen Herzen nach Ischämie und unter Kontrollbedingung, noch zwischen Herzen von Wildtyptieren und $Ap-2\alpha^{-/+}$ -Tieren (Abbildung 8).

3.2.3 Apoptosenachweis mittels Caspase 3/7-Aktivitätsmessung

Die Caspase 3/7-Aktivität im Ventrikelgewebe der perfundierten Herzen wurde luminometrisch bestimmt. Dabei zeigte sich sowohl bei den Wildtyp-Tieren als auch bei den $Ap-2\alpha^{-/+}$ -Tieren ein signifikanter Anstieg der Caspaseaktivität bei den Herzen nach Ischämie im Vergleich zur Kontrollbedingung ($p < 0,05$). Es zeigte sich jedoch weder bei den Herzen nach Ischämie noch unter Kontrollbedingungen ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und $Ap-2\alpha^{-/+}$ (Abbildung 9).

3.3 Untersuchungen an der $Crem^{-/-}$ -Linie

In den Versuchen mit dieser Mäuselinie wurden Herzen von männlichen und weiblichen $Crem^{-/-}$ -Tieren im Alter von 14 bis 17 Wochen verwendet. Als Vergleich dienten männliche und weibliche Wildtyp-Tiere des gleichen Alters aus der gleichen Linie.

Herzen dieser Tiere wurden im Langendorff-Modus retrograd perfundiert. Nach einer 30-minütigen Äquilibrationsphase folgten eine 60-minütige Ischämiephase sowie eine 4-stündige Reperfusionphase. Dieses experimentelle Protokoll hatte sich in den Vorexperimenten (s. 3.1) als geeignet erwiesen, da hier ein signifikanter Anstieg der Caspase 3/7-Aktivität gemessen werden konnte (s. Abbildung 4).

3.3.1 Apoptosenachweis durch DNA-Fragmentierung

Aus dem Ventrikelgewebe der perfundierten Herzen wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion DNA aufgereinigt und auf einem 1,5-prozentigen Agarosegel elektrophoretisch getrennt. In allen DNA-Proben dieser Herzen, bei denen ein Ischämie-Reperfusionsschaden ausgelöst worden war, fand sich das typische Bild der „DNA-Leiter“, d. h. DNA-Fragmente, die Vielfache von 180 Basenpaaren lang sind (Abbildung 10).

Um die Stärke der DNA-Fragmentierung quantitativ auswerten zu können, wurde jeweils die Dichte der 180-Basenpaar-Bande bestimmt. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen Wildtyp und $Crem^{-/-}$ (Abbildung 11).

3.3.2 Apoptosenachweis mittels Caspase 3/7-Aktivitätsmessung

Die Caspase 3/7-Aktivität im Ventrikelgewebe der perfundierten Herzen wurde luminometrisch bestimmt. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Herzen von Wildtyptieren und *Crem*^{-/-}-Tieren (Abbildung 12).

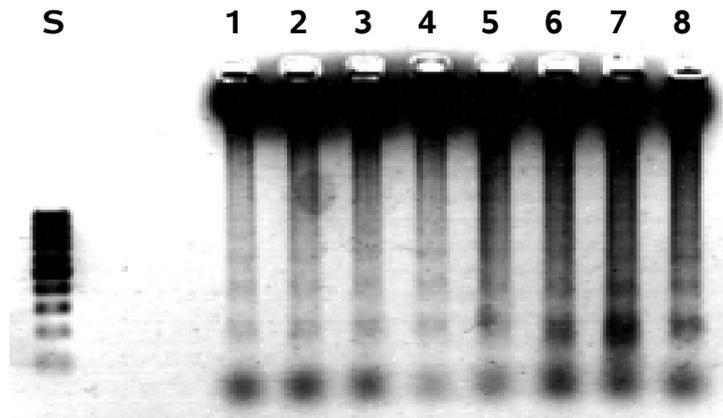


Abbildung 1: Abhängigkeit der DNA-Fragmentierung von der Länge der Ischämie- und Reperfusionsphase

Herzen von Wildtyp-Mäusen wurden im Langendorff-Modus retrograd perfundiert. Nach 30 Minuten Perfusion erfolgte eine Ischämiephase ohne Fluss, danach wurden die Herzen reperfundiert.

„DNA-Leitern.“ Jeweils 5 µg der aufgearbeiteten DNA wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Als Standard dienten 0,3 µg einer 100 bp-DNA-Leiter. Invertierte Darstellung.

Spuren 1,2,3,4: Ischämie während 40 min, Reperfusion während 4 h.

Spuren 5,6: Ischämie während 50 min, Reperfusion während 4 h.

Spuren 7,8: Ischämie während 60 min, Reperfusion während 4 h.

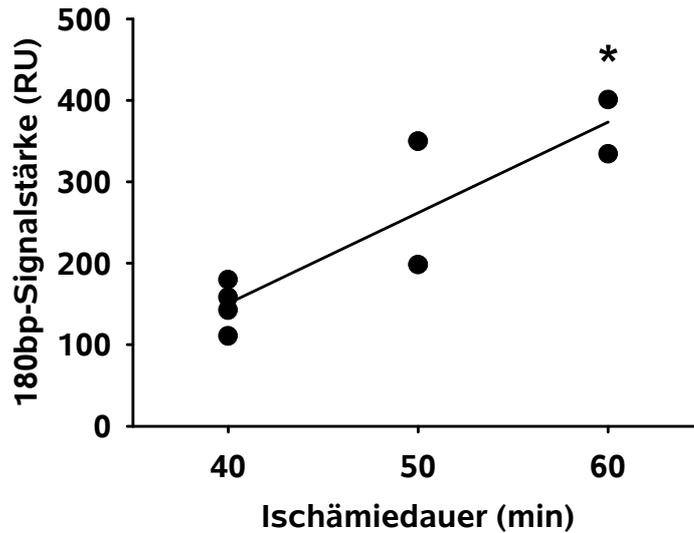


Abbildung 2: Abhängigkeit der DNA-Fragmentierung von der Länge der Ischämie- und Reperfusionphase

Herzen von Wildtyp-Mäusen wurden im Langendorff-Modus retrograd perfundiert. Nach 30 Minuten Perfusion erfolgte eine Ischämiephase ohne Fluss, danach wurden die Herzen für 4 Stunden reperfundiert.

Statistische Auswertung. Zur Quantifizierung der DNA-Fragmentierung wurde die Stärke der 180 bp-Bande herangezogen.

Der * kennzeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zu 40 min Ischämie.

Das Bestimmtheitsmaß (r^2) der gezeigten Regressionsgraden beträgt 0,80 ($p = 0,003$).

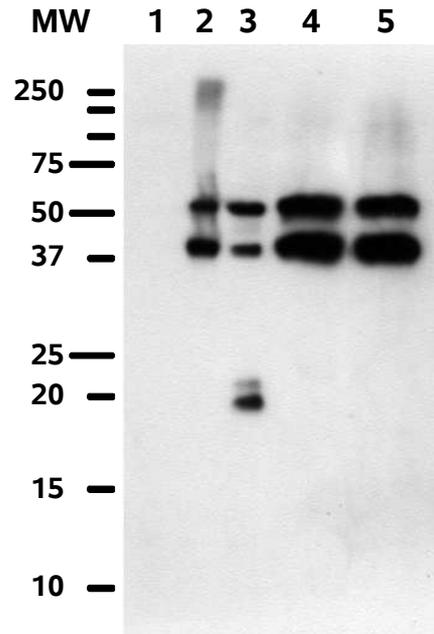


Abbildung 3: Kontrollen für den verwendeten Lamin A-Antikörper

Western Blot. Zellen (HUVEC) aus Zellkultur wurden aufgearbeitet, jeweils 25 µg Protein wurden auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit einem Antikörper gegen gespaltenes Lamin A inkubiert. Die Visualisierung erfolgte durch Inkubation mit einem peroxidase markierten Zweitantikörper und Chemolumineszenz (ECL).

MW: Molekulargewicht in kDa

Spur 1: unbehandelte Zellen

Spur 2: adhärenente Zellen nach Entzug von Wachstumsfaktoren

Spur 3: abgelöste Zellen nach Entzug von Wachstumsfaktoren für 4 h

Spuren 4,5: abgelöste Zellen nach Entzug von Wachstumsfaktoren über Nacht

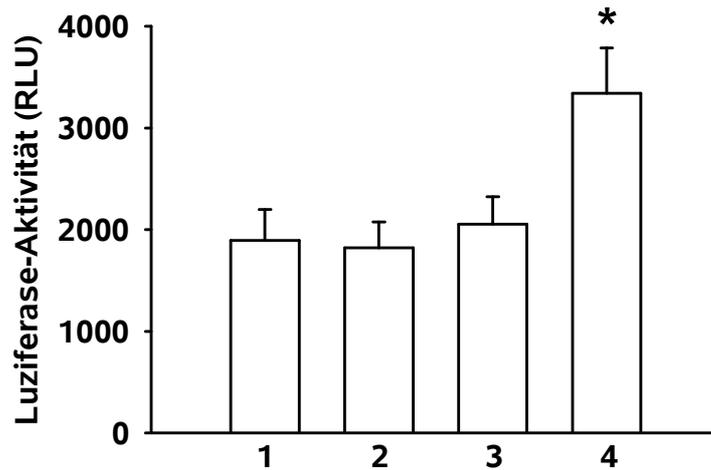


Abbildung 4: Caspase 3/7-Aktivität in Mäuseherzen abhängig von der Perfusions- und Ischämiedauer – gemessen als DEVD-Spaltung

Herzen von Wildtyp-Mäusen wurden nach Langendorff retrograd perfundiert. Teilweise wurde nach 30 Minuten Perfusion eine globale Ischämie des Herzens ausgelöst, danach erfolgte eine Reperfusion.

- 1: 30 min Perfusion, n=6
- 2: 30 min Perfusion; 30 min Ischämie; 90 min Reperfusion, n=6
- 3: 30 min Perfusion; 40 min Ischämie; 4 h Reperfusion, n=6
- 4: 30 min Perfusion; 60 min Ischämie; 4 h Reperfusion, n=7

Der * kennzeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zu den Gruppen 1, 2 und 3.

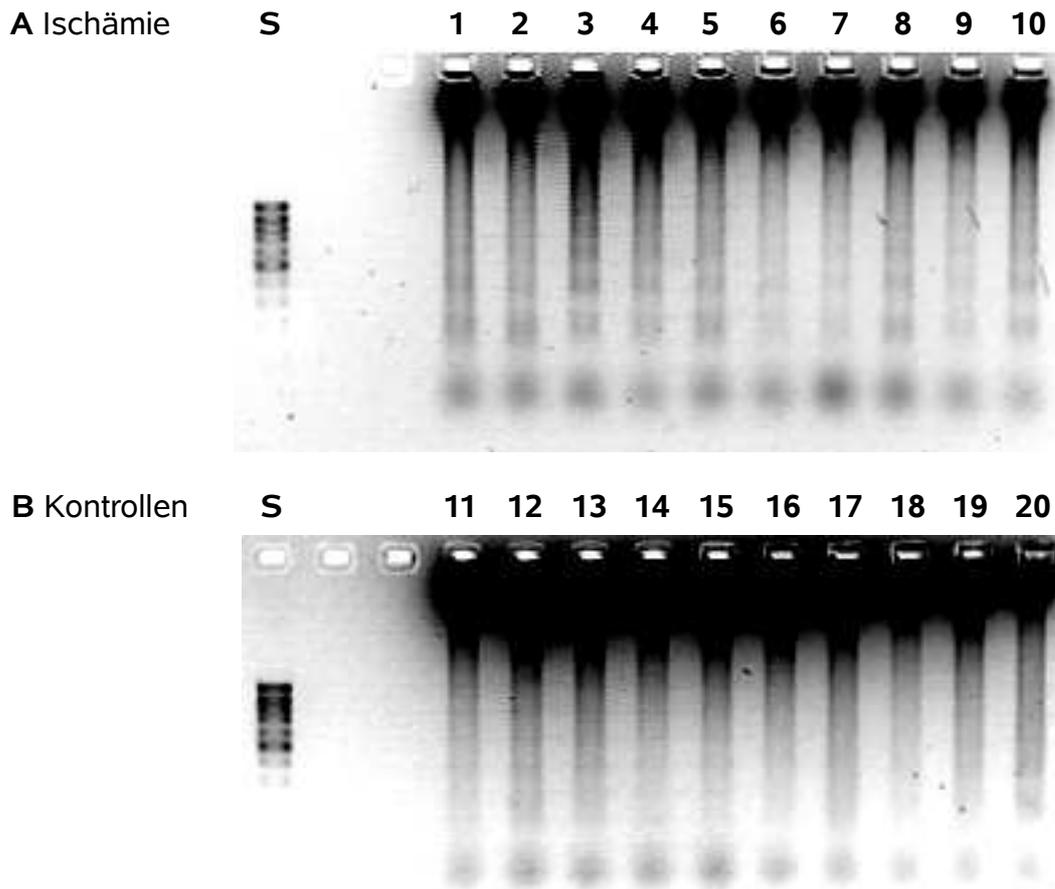


Abbildung 5: Ischämieempfindlichkeit bei Herzen von $Ap-2\alpha^{-/+}$ -Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Herzen – gemessen durch DNA-Fragmentierung

Herzen von Mäusen aus der $Ap-2\alpha^{-/+}$ -Linie wurden im Langendorff-Modus retrograd perfundiert. Nach 30 Minuten Perfusion erfolgte eine Ischämiephase ohne Fluss während 60 Minuten, danach wurden die Herzen während 4 Stunden reperfundiert. Kontrollherzen wurden jeweils 30 Minuten perfundiert, ohne eine Ischämie auszulösen.

„DNA-Leitern.“ Jeweils 5 μ g der aufgearbeiteten DNA wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Als Standard dienten 0,3 μ g einer 100 bp-DNA-Leiter. Invertierte Darstellung.

- | | |
|---|--|
| A Ischämie: Spuren 1,3,5,7,9: | WT, Ischämie |
| Spuren 2,4,6,8,10: | $Ap-2\alpha^{-/+}$, Ischämie |
| B Kontrollen: Spuren 11,13,15,17,19: | WT, Kontrollbedingung |
| Spuren 12,14,16,18,20: | $Ap-2\alpha^{-/+}$, Kontrollbedingung |

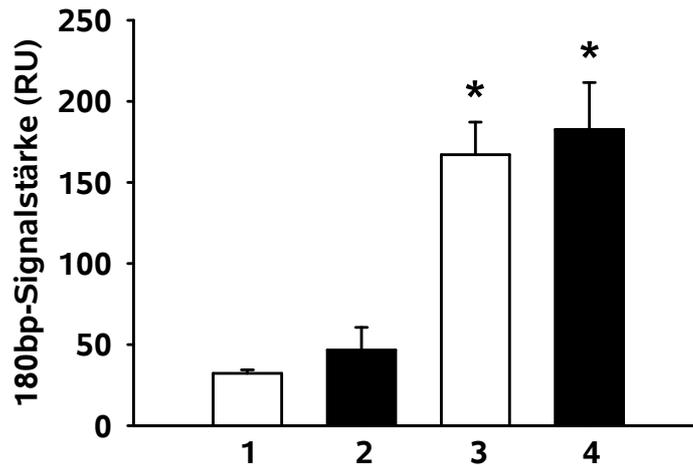


Abbildung 6: Ischämieempfindlichkeit bei Herzen von $Ap-2\alpha^{-/+}$ -Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Herzen – gemessen durch DNA-Fragmentierung

Herzen von Mäusen aus der $Ap-2\alpha^{-/+}$ -Linie wurden im Langendorff-Modus retrograd perfundiert. Nach 30 Minuten Perfusion erfolgte eine Ischämiephase ohne Fluss während 60 Minuten, danach wurden die Herzen während 4 Stunden reperfundiert. Kontrollherzen wurden jeweils 30 Minuten perfundiert, ohne eine Ischämie auszulösen.

Statistische Auswertung. Zur Quantifizierung der DNA-Fragmentierung wurde die Stärke der 180 bp-Bande herangezogen.

- 1: WT, Kontrollbedingung, n=5
- 2: $Ap-2\alpha^{-/+}$, Kontrollbedingung, n=5
- 3: WT, Ischämie, n=5
- 4: $Ap-2\alpha^{-/+}$, Ischämie, n=5

Der * zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) gegenüber der Kontrollbedingung.

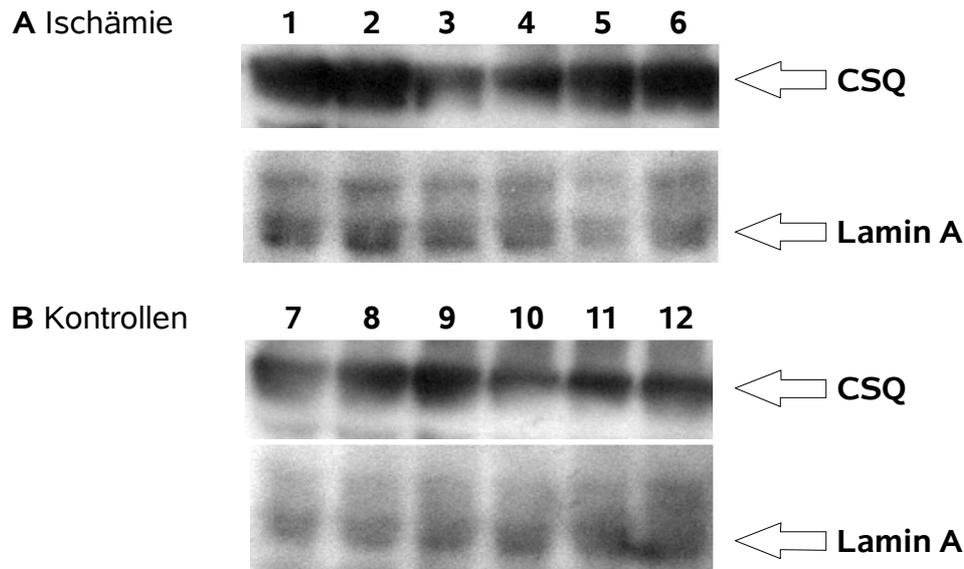


Abbildung 7: Ischämieempfindlichkeit bei Herzen von $Ap-2\alpha^{-/+}$ -Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Herzen – gemessen durch Lamin A-Spaltung

Herzen von Mäusen aus der $Ap-2\alpha^{-/+}$ -Linie wurden im Langendorff-Modus retrograd perfundiert. Nach 30 Minuten Perfusion erfolgte eine Ischämiephase ohne Fluss während 60 Minuten, danach wurden die Herzen während 4 Stunden reperfundiert. Kontrollherzen aus beiden Gruppen wurden jeweils 30 Minuten perfundiert, ohne eine Ischämie auszulösen.

Western Blot. Nach Gewebeaufarbeitung wurden jeweils 100 µg Protein auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen gespaltenes Lamin A und, zur Beladungskontrolle, gegen Calsequestrin (CSQ) inkubiert. Die Visualisierung erfolgte jeweils durch Inkubation mit einem peroxidasemarkierten Zweitantikörper und Chemolumineszenz (ECL).

- A Ischämie:** Spuren 1,3,5: WT, Ischämie
 Spuren 2,4,6: $Ap-2\alpha^{-/+}$, Ischämie
- B Kontrollen:** Spuren 7,9,11: WT, Kontrollbedingung
 Spuren 8,10,12: $Ap-2\alpha^{-/+}$, Kontrollbedingung

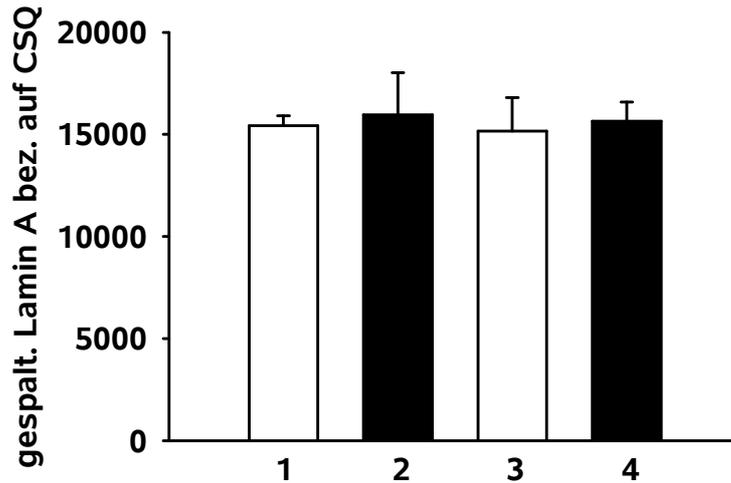


Abbildung 8: Ischämieempfindlichkeit bei Herzen von $Ap-2\alpha^{-/+}$ -Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Herzen – gemessen durch Lamin A-Spaltung

Herzen von Mäusen aus der $Ap-2\alpha^{-/+}$ -Linie wurden im Langendorff-Modus retrograd perfundiert. Nach 30 Minuten Perfusion erfolgte eine Ischämiephase ohne Fluss während 60 Minuten, danach wurden die Herzen während 4 Stunden reperfundiert. Kontrollherzen aus beiden Gruppen wurden jeweils 30 Minuten perfundiert, ohne eine Ischämie auszulösen.

Statistische Auswertung. Zur Quantifizierung wurde jeweils, zum Ausgleich von Beladungsunterschieden, die Lamin A-Bande auf die Calsequestrin-Bande bezogen.

- 1: WT, Kontrollbedingung, n=5
- 2: $Ap-2\alpha^{-/+}$, Kontrollbedingung, n=4
- 3: WT, Ischämie, n=5
- 4: $Ap-2\alpha^{-/+}$, Ischämie, n=5

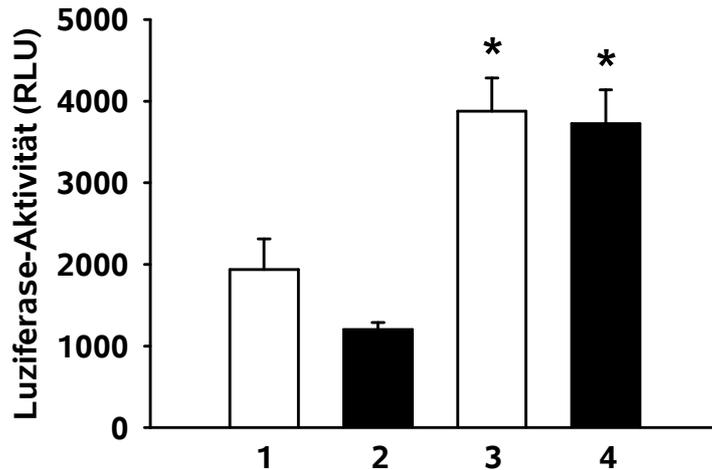


Abbildung 9: Ischämieempfindlichkeit bei Herzen von $Ap-2\alpha^{-/+}$ -Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Herzen – gemessen als DEVD-Spaltung durch Caspase 3/7

Herzen von Mäusen aus der $Ap-2\alpha^{-/+}$ -Linie wurden im Langendorff-Modus retrograd perfundiert. Nach 30 Minuten Perfusion erfolgte eine Ischämiephase ohne Fluss während 60 Minuten, danach wurden die Herzen während 4 Stunden reperfundiert. Kontrollherzen aus beiden Gruppen wurden jeweils 30 Minuten perfundiert, ohne eine Ischämie auszulösen.

Nach Gewebeaufarbeitung wurde die Caspase 3/7-Aktivität in den Proben anhand der Spaltung eines luminogenen Caspase 3/7-Substrates gemessen.

- 1: WT, Kontrollbedingung, n=4
- 2: $Ap-2\alpha^{-/+}$, Kontrollbedingung, n=3
- 3: WT, Ischämie, n=5
- 4: $Ap-2\alpha^{-/+}$, Ischämie, n=5

Der * zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) gegenüber der Kontrollbedingung.

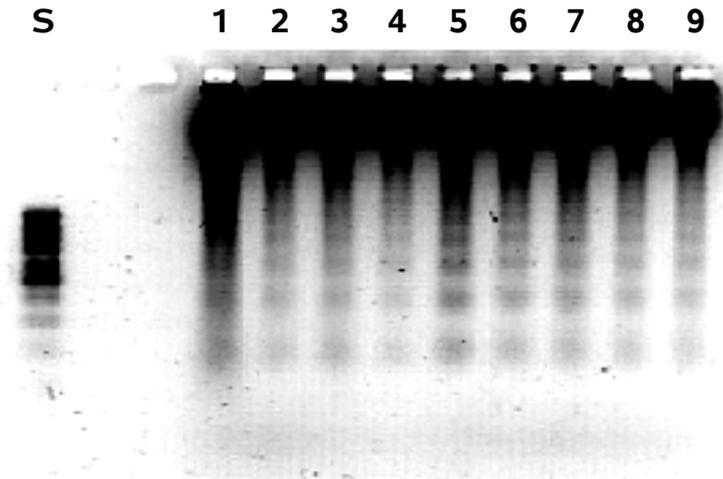


Abbildung 10: Ischämieempfindlichkeit bei Herzen von *Crem*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Herzen – gemessen durch DNA-Fragmentierung

Herzen von Mäusen aus der *Crem*^{-/-}-Linie wurden im Langendorff-Modus retrograd perfundiert. Nach 30 Minuten Perfusion erfolgte eine Ischämiephase ohne Fluss während 60 Minuten, danach wurden die Herzen während 4 Stunden reperfundiert.

„DNA-Leitern.“ Jeweils 5 µg der aufgearbeiteten DNA wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Als Standard dienten 0,3 µg einer 100 bp-DNA-Leiter. Invertierte Darstellung.

Spuren 1,2,3,4,5: *Crem*^{-/-}

Spuren 6,7,8,9: WT

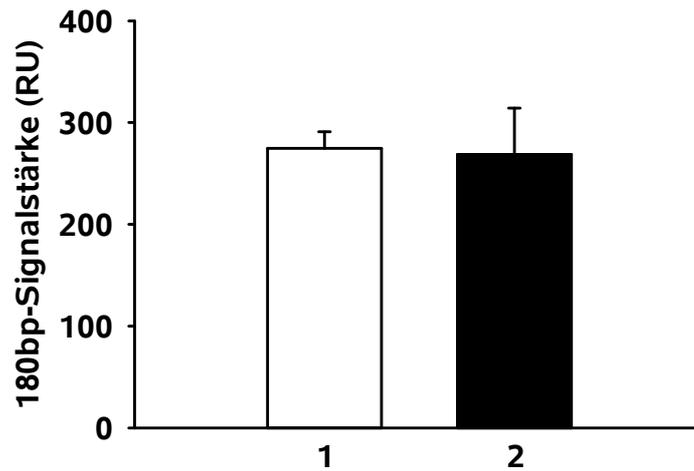


Abbildung 11: Ischämieempfindlichkeit bei Herzen von Crem^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Herzen – gemessen durch DNA-Fragmentierung

Herzen von Mäusen aus der CREM-KO-Linie wurden im Langendorff-Modus retrograd perfundiert. Nach 30 Minuten Perfusion erfolgte eine Ischämiephase ohne Fluss während 60 Minuten, danach wurden die Herzen während 4 Stunden reperfundiert.

Statistische Auswertung. Zur Quantifizierung der DNA-Fragmentierung wurde die Stärke der 180 bp-Bande herangezogen.

- 1: WT, n=4
- 2: Crem^{-/-}, n=5

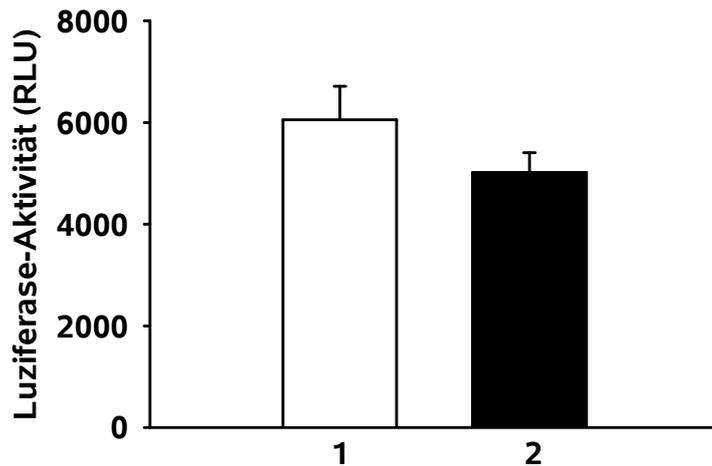


Abbildung 12: Ischämieempfindlichkeit bei Herzen von *Crem*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Herzen – gemessen als DEVD-Spaltung durch Caspase 3/7

Herzen von Mäusen aus der *Crem*^{-/-}-Linie wurden im Langendorff-Modus retrograd perfundiert. Nach 30 Minuten Perfusion erfolgte eine Ischämiephase ohne Fluss während 60 Minuten, danach wurden die Herzen während 4 Stunden reperfundiert.

Nach Gewebeaufarbeitung wurde die Caspase 3/7-Aktivität in den Proben anhand der Spaltung eines luminogenen Caspase 3/7-Substrates gemessen.

- 1: WT, n=6
- 2: *Crem*^{-/-}, n=5

4 Diskussion

4.1 Hauptergebnisse der Arbeit

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe eines Ischämie-/Reperfusionmodells der Einfluss zweier genetischer Veränderungen auf die Apoptoseempfindlichkeit des Mausmyokards untersucht. Mausherzen wurden nach Langendorff (1895) *in-vitro* perfundiert. Während des Versuchs wurde der Perfusatfluss unterbrochen, vergleichbar mit einer Globalischämie des Herzens, gefolgt von einer Phase der Reperfusion. Diese Abfolge von Ischämie und Reperfusion löste im Myokard der perfundierten Herzen Apoptose aus, die sich durch eine erhöhte Aktivität der Effektorcaspasen 3 bzw. 7, sowie durch das Auftreten einer typischen Spaltung der DNA in Fragmente, die Vielfache von 180 bp lang sind, nachweisen ließ. Diese Behandlung hatte hingegen keinen Einfluss auf das Auftreten von Spaltprodukten des Strukturproteins Lamin A, eines Proteins, das im Rahmen der Apoptosekaskade durch die Effektorcaspase 6 gespalten werden kann. Mit Hilfe der genannten Methoden wurden Tiere, bei denen das Gen für den Transkriptionsfaktor AP-2 α heterozygot ausgeschaltet war ($Ap-2\alpha^{-/+}$), sowie Tiere, bei denen das Gen für den Transkriptionsfaktor CREM homozygot ausgeschaltet war ($Crem^{-/-}$), jeweils im Vergleich zu Wildtyptieren aus der entsprechenden Linie untersucht. Herzen von $Ap-2\alpha^{-/+}$ -Tieren zeigten nach Ischämie und Reperfusion im Vergleich zu Herzen aus Wildtyp-Kontrolltieren keine Unterschiede in der Caspaseaktivität und der DNA-Fragmentierung; ebenso zeigten auch Herzen von $Crem^{-/-}$ -Tieren nach Ischämie und Reperfusion im Vergleich zu Herzen aus Wildtyp-Kontrolltieren keine Unterschiede hinsichtlich Caspaseaktivität und DNA-Fragmentierung.

4.2 Methoden zur experimentellen Auslösung und Erfassung von Apoptose im adulten Herzen

In der vorliegenden Arbeit konnte *in-vitro* am ganzen Herzen durch die Auslösung einer Globalischämie, gefolgt von einer Reperusionsphase, Apoptose ausgelöst und mit zwei verschiedenen Methoden nachgewiesen werden. Die experimentelle Auslösung von Ischämie mit darauf folgender Reperfusion ist in der Literatur vielfach beschrieben, so als Modell zur Auslösung von Apoptose,

oder zur Erfassung der pathophysiologischen Vorgänge im Rahmen eines Herzinfarktes. Sie ist *in-vivo* – z. B. durch Ligation einer Koronararterie (wie bei Michael et al. 1995, Bialik et al. 1997, Jones et al. 1999, Condorelli et al. 2001, Cerniway et al. 2001), *in-vitro* – in Versuchen am extrakorporal perfundierten vollständigen Organ (wie bei Sumeray & Yellon 1998, Cerniway et al. 2001, Chapman et al. 2002, Hofstaetter et al. 2002) und in Versuchen an Zellkulturen (wie bei Chapman et al. 2002, Hofstaetter et al. 2002) möglich. Bei Versuchen an Zellkulturen wird eine Annäherung an „ischämische“ Bedingungen durch Sauerstoff- und Energiereduktion im Kulturmedium erreicht. In der vorliegenden Arbeit wurden die Versuche am extrakorporal perfundierten ganzen Herzen durchgeführt, da so die Physiologie des Organs annähernd erhalten blieb, während Versuchsparameter wie Perfusionsdruck, Perfusatzusammensetzung und Perfusatemperatur besser zu standardisieren waren als im *in-vivo*-Modell.

Bisher ist ungeklärt, ob eine Myokardischämie allein ausreicht, um Apoptose auszulösen, oder ob dazu eine Reperfusionphase nötig ist. Unterschiedliche Studien kamen hier zu unterschiedlichen Aussagen. Während einige Gruppen nach einer Ischämiephase keine Zeichen für Apoptose fanden, sondern Apoptose erst nach einer Reperfusionphase nachweisbar war (Gottlieb et al. 1994, Zhao et al. 2000), konnten andere bereits nach einer verlängerten Ischämiephase Apoptose beobachten. Jedoch trat auch hier Apoptose in Verbindung mit Reperfusion stärker und schon nach kürzerer Ischämiezeit auf (Anversa et al. 1998, Borutaite et al. 2003). Ob die unterschiedlichen Befunde dieser verschiedenen Arbeitsgruppen auf Grund unterschiedlicher Apoptosemodelle oder unterschiedlicher Verfahren des Apoptosenachweises zustande gekommen sind, ist nicht klar. Da jedoch alle Gruppen übereinstimmend fanden, dass eine Abfolge von Ischämie- und Reperfusionphase Apoptose auslöst, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Versuchsprotokoll ausgewählt, das eine Ischämie- und eine Reperfusionphase vorsah. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass eine 60-minütige Ischämiephase, gefolgt von einer 240-minütigen Reperfusionphase, zu einer signifikant erhöhten Caspaseaktivität führte, während Versuchsprotokolle mit kürzeren Ischämie- und Reperfusionzeiten noch keinen signifikanten Einfluss auf die Caspaseaktivität hatten.

Apoptose kann durch verschiedene Methoden nachgewiesen und von anderen Formen des Zelltodes (wie Nekrose) unterschieden werden. Dazu werden Stoffwechselprozesse gemessen, die spezifisch für die Apoptosekaskade sind. In der vorliegenden Untersuchung wurden drei verschiedene Methoden zum Nachweis von Apoptose angewandt.

Die Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7 ist der früheste gemeinsame Schritt des intrinsischen und extrinsischen Weges der Apoptoseaktivierung. Beim intrinsischen (mitochondrienassoziierten) Weg der Apoptoseauslösung wird Caspase 3 initial durch aktivierte Caspase 9 proteolytisch aktiviert, während beim extrinsischen (rezeptorvermittelten) Weg Caspase 3 durch aktive Caspase 8 aktiviert wird. Es ist zwar möglich, die der Aktivierung von Caspase 3 vorausgehenden Parameter der Apoptosekaskade zu messen – z. B. die Aktivität der Caspasen 8 und 9 oder die Expression der pro- und antiapoptischen Proteine Bcl-2 und Bax/Bak – jedoch sind diese Parameter für den intrinsischen (Aktivität von Caspase 9, Expression von Bcl-2, Bax und Bak) bzw. den extrinsischen (Aktivität von Caspase 8) Weg der Apoptoseaktivierung spezifisch. Wie stark beide Wege an der Gesamtapoptose von Kardiomyozyten beteiligt sind, ist noch nicht völlig geklärt und scheint darüber hinaus auch von Vorschädigungen des Myokards sowie von der Art des Apoptosereizes abzuhängen (Nakamura et al. 2000, Yamaoka et al. 2000, Wu et al. 2002, Gomez et al. 2005, Liao et al. 2005). Als früher Parameter der Apoptose wurde in der vorliegenden Arbeit die Gesamtaktivität der Caspasen 3 und 7 bestimmt.

Nachdem Caspase 3 als zentrale Effektorcaspase aktiviert ist, kann sie ihrerseits weitere Effektorcaspasen proteolytisch aktivieren, darunter die Caspasen 6 und 7 (Übersicht bei Mirkes 2002). Ein Substrat der Caspase 6 (nicht jedoch der Caspase 3) ist das Lamin A (Takahashi et al. 1996), ein Protein aus der Gruppe der Lamine, die wichtige Strukturproteine des Cytoskeletts an der inneren Kernmembran sind (McKeon 1991). Die Spaltung von Laminen im Rahmen der apoptotischen Kaskade erleichtert den Prozess der Chromatinkondensation und Zellkernschrumpfung, der nur verzögert abläuft, wenn die Laminspaltung unterbleibt (Rao et al. 1996). Die Spaltung von Laminen folgt damit zeitlich auf die Aktivierung der Caspase 3, geht aber dem Abbau der DNA voraus. Die

Spaltung von Lamin A kann gezeigt werden, indem die spezifischen Spaltprodukte, die durch Caspase 6-vermittelte Proteolyse entstehen, nachgewiesen werden.

Die Fragmentierung der DNA durch die caspaseaktivierte DNase CAD ist ein später Schritt in der Apoptosekaskade und führt schließlich zum irreversiblen Funktionsverlust der apoptotischen Zelle. Da die CAD die DNA spezifisch zwischen Nukleosomen spaltet, ergeben sich Fragmente, die Vielfache von 180 bp lang sind (Wyllie 1980). Diese Fragmente ergeben in der DNA-Elektrophorese das typische Bild der „DNA-Leiter“. Da sich diese spezifische Art der Fragmentierung von der ungerichteten DNA-Degradation (nach Proteolyse der Nukleosomen) im Rahmen eines nekrotischen Zellunterganges deutlich unterscheidet, kann sie als spezifischer Nachweis der fortgeschrittenen Apoptose dienen.

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass im verwendeten Modell die Abfolge von Ischämie und Reperfusion des Herzens zu einer Aktivierung von Effektorcaspasen führte. Da die verwendete Methode die gemeinsame Aktivität von Caspase 3 und Caspase 7 erfasst, kann über die Beiträge der einzelnen Caspasen zur gemessenen Gesamtaktivität keine Aussage getroffen werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass Ischämie und Reperfusion am verwendeten Modell im Herzen eine typische apoptosespezifische DNA-Fragmentierung auslösten, die zum Bild der „DNA-Leiter“ führte.

Demgegenüber konnte im verwendeten Modell kein Anstieg der Spaltung von Lamin A gemessen werden. Dieses weist darauf hin, dass bei der durch Ischämie und Reperfusion ausgelösten Apoptose in Herzmuskelzellen keine Aktivierung von Caspase 6 stattfindet. Dieses ist konsistent mit den Ergebnissen anderer Gruppen, die zeigten, dass die Beteiligung von Caspase 6 an der Apoptosekaskade im Herzen von der auslösenden Noxe abhängt. So führten Superoxidationen (O_2^-), nicht jedoch Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hyperthermie, 4-Hydroperoxycyclophosphamid oder Staurosporin zur Aktivierung von Caspase 6 in Kardiomyozyten (von Harsdorf et al. 1999, Little et al. 2003).

Insgesamt lässt sich folgern, dass die verwendete Abfolge von Ischämie und Reperfusion geeignet war, im vorliegenden Modell Apoptose auszulösen, die

durch einen frühen Parameter (Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7) und einen späten Parameter (Fragmentierung der DNA) nachweisbar war.

4.3 Ergebnisse der Untersuchungen an heterozygoten $Ap-2\alpha^{-/+}$ -Tieren

Sowohl in Herzen von heterozygoten $Ap-2\alpha^{-/+}$ -Tieren als auch in Herzen von Wildtyp-Tieren aus der gleichen Linie ließ sich mit der beschriebenen Abfolge von Ischämie und Reperfusion Apoptose auslösen, die durch eine Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 sowie durch das Auftreten einer DNA-Fragmentierung zu erfassen war. Es zeigten sich jedoch keine Unterschiede im Ausmaß der Apoptose zwischen $Ap-2\alpha^{-/+}$ -Tieren und Wildtyp-Kontrolltieren, weder unter Basalbedingungen, noch nach Ischämie und Reperfusion. Dieses führt zu dem Schluss, dass $Ap-2\alpha^{-/+}$ -Tiere keine veränderte Empfindlichkeit des Myokards auf eine Schädigung durch Ischämie und Reperfusion aufweisen. Eine Interpretation dieses Ergebnisses im Hinblick auf die Ausgangshypothese, dass der Transkriptionsfaktor AP-2 α eine Bedeutung in der Ausbildung kardialer Apoptose hat und seine Reduktion eine verminderte Empfindlichkeit des Myokards auf Apoptosereize bewirkt, ist jedoch schwierig, da das verwendete Tiermodell eine wichtige Limitation aufwies: Es standen lediglich heterozygote ($Ap-2\alpha^{-/+}$) Tiere für die Untersuchungen zur Verfügung. Dieses ist darin begründet, dass Tiere, denen beide Allele fehlen ($Ap-2\alpha^{-/-}$), aufgrund schwerer cranio-thoraco-abdominaler Missbildungen bei der Geburt sterben (Schorle et al. 1996, Zhang et al. 1996). Da in den für die Untersuchungen verwendeten Tieren ein intaktes Allel vorhanden war, war die Expression von AP-2 α nicht völlig ausgeschaltet, sondern es war von einer verminderten Expression auszugehen. Insgesamt finden sich in der Literatur lediglich zwei Untersuchungen an $Ap-2\alpha^{-/+}$ -Tieren. Lim et al. (2005) fanden einen starken Gendosiseffekt von AP-2 α auf die Expression des fragile X mental retardation-1 (*Fmr1*)-Genes. Diese war in $Ap-2\alpha^{-/-}$ -Embryonen vierfach und in $Ap-2\alpha^{-/+}$ -Embryonen noch zweifach gegenüber Wildtypen reduziert. Kohlbecker et al. (2002) untersuchten $Ap-2\alpha$ -heterozygote Embryonen und fanden bei einem Teil von ihnen Missbildungen, die mit einer partiellen Exenzephalie einhergingen. Diese beiden Untersuchungen sprechen

zwar für einen Effekt einer heterozygoten Ausschaltung von *Ap-2α*, jedoch ist ihnen gemeinsam, dass beide Arbeitsgruppen nur Embryonen untersuchten; eine Aussage über einen Phänotyp adulter Tiere trafen sie nicht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine heterozygote Ausschaltung von *Ap-2α* keinen Einfluss auf die Apoptoseempfindlichkeit des Myokards hat. Über einen möglichen Effekt eines völligen Fehlens von AP-2α kann nach dieser Untersuchung noch keine abschließende Aussage getroffen werden. Hierzu werden weitere Untersuchungen an anderen Modellen notwendig sein. Denkbar sind hier etwa die herzspezifische Überexpression der dominant-negativen Form AP-2αB oder die gezielte gewebespezifische Ausschaltung von *Ap-2α* im Myokard mittels des Cre-*loxP*-Systems, bei dem das gewebsspezifisch exprimierte Enzym Cre (cyclization recombination) aus dem Bakteriophagen P1 die Exzision von DNA zwischen zwei flankierenden *loxP* (locus of X-over of P1)-Sequenzen bewirkt (Übersicht bei Sauer 1998).

4.4 Ergebnisse der Untersuchungen an *Crem*-Knockouttieren

Herzen von *Crem*-Knockouttieren (*Crem*^{-/-}) durchliefen die gleiche Abfolge von Ischämie und Reperfusion, bei der sich in Herzen von Tieren aus der *Ap-2α*^{-/+}-Linie eine deutliche Auslösung von Apoptose gezeigt hatte. Auch in diesen Herzen zeigte sich eine deutliche Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 sowie eine DNA-Fragmentierung. Es zeigten sich jedoch keine Unterschiede im Ausmaß der Apoptose zwischen *Crem*^{-/-}-Tieren und Wildtyp-Kontrolltieren. Dieses deutet darauf hin, dass *Crem*-Knockouttiere im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren keine veränderte Empfindlichkeit des Myokards auf eine Schädigung durch Ischämie und Reperfusion aufweisen. Da das Fehlen des Transkriptionsfaktors CREM also keinen Einfluss auf die Apoptose in den untersuchten Herzen hatte, führt dieses zu dem Schluss, dass CREM keine wesentliche Rolle für die Apoptose in adulten Mauserherzen spielt, oder dass dieses Fehlen in Knockouttieren kompensiert werden kann, etwa durch andere Transkriptionsfaktoren aus der CREB/CREM/ATF1-Familie. Hinweise, dass die Transkriptionsfaktoren dieser Familie teilweise funktionell redundant sind, ergaben sich in mehreren Modellen. So zeigten Tiere, bei denen durch globale Deletion des

Exons 2 des *Creb*-Genes die Bildung der Isoformen CREB α und CREB Δ verhindert wurde, einen weitgehend normalen Phänotyp (Hummler et al. 1994), abgesehen von Einschränkungen des Langzeitgedächtnisses (Bourtchuladze et al. 1994). Bei diesen Tieren war die Expression einer weiteren aktivierenden Isoform von CREB, CREB β , die das Exon 2 nicht enthält, sowie die Expression der aktivierenden CREM-Isoform CREM τ kompensatorisch erhöht, was zum milden Phänotyp beitragen könnte (Hummler et al. 1994, Blendy et al. 1996b). Eine globale Deletion des Exons 10 des *Creb*-Genes hingegen, die die Expression aller funktionellen CREB-Isoformen verhindert, führte zum perinatalen Sterben der entsprechenden Knockouttiere, obwohl auch hier die Expression von CREM erhöht war (Rudolph et al. 1998). In einem anderen Tiermodell wurden Tiere, bei denen gewebsspezifisch das Exon 10 des *Creb*-Genes im Gehirn ausgeschaltet wurde, mit *Crem*^{-/-}-Tieren gekreuzt. Nur bei Tieren, bei denen im Gehirn sowohl *Creb* als auch *Crem* inaktiviert waren, trat in der Embryonalphase eine verstärkte Apoptose von Neuronen im Cortex auf. Diese Tiere starben dann kurz nach der Geburt, wahrscheinlich, weil sie nicht trinken konnten. Kontrolltiere, bei denen jeweils nur *Creb* allein oder nur *Crem* allein inaktiviert waren, zeigten diese Apoptose nicht (Mantamadiotis et al. 2002).

Beide genannten Untersuchungen weisen auf ein komplexes Zusammenspiel der Transkriptionsfaktoren der CREB/CREM/ATF1-Familie hin und zeigen, dass unter bestimmten Bedingungen das Fehlen eines dieser Transkriptionsfaktoren die Überexpression eines anderen verursacht, und das Fehlen dadurch nahezu vollständig kompensiert sein kann. Unsere Hypothese war, dass bei *Crem*-Knockoutmäusen das Fehlen des CREM-Repressors ICER zu einer größeren Apoptoseresistenz führt. Möglicherweise wird dieses Fehlen aber in *Crem*-Knockouttieren durch die Hochregulation einer inhibitorischen Isoform von CREB oder ATF1 ausgeglichen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Fehlen des Transkriptionsfaktors CREM keine Veränderung in der Apoptoseempfindlichkeit des Myokards bewirkt. Dieses ist möglicherweise auf eine Kompensation der fehlenden CREM-Funktion durch andere Transkriptionsfaktoren der CREB/CREM/ATF1-Familie zurückzuführen. Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um

diese Annahme zu überprüfen, beispielsweise in Tiermodellen, bei denen im Herzen neben CREM noch CREB bzw. ATF1 ausgeschaltet ist.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Ätiologie der menschlichen Herzinsuffizienz, einer Erkrankung, die mit einer den malignen Tumoren vergleichbar schlechten Prognose einhergeht, ist nach wie vor wenig verstanden. Es gibt jedoch Hinweise, dass die Apoptose von Kardiomyozyten bei ihrer Entstehung eine wichtige Rolle spielt, da schon ein geringer Anstieg der Apoptoserate in einem terminal differenzierten Gewebe wie dem Myokard einen großen kumulativen Effekt haben kann. Vorarbeiten zeigten, dass die Transkriptionsfaktoren AP-2 α und CREM an der Regulation der Apoptose im Herzen beteiligt sind und führten zu der Hypothese, dass ihre Inaktivierung im Herzen zu einer erhöhten Apoptoseresistenz des Myokards führen würde. Dieses ließ sich in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen. Es werden jedoch weitere Untersuchungen notwendig sein, um Limitationen des verwendeten Modells zu umgehen (im Falle von AP-2 α) bzw. um mögliche Kompensationsmechanismen zu erkennen (im Falle von CREM). Beide Transkriptionsfaktoren sind nach wie vor ein lohnendes Ziel und eine Herausforderung für weitere Forschungsvorhaben in der Hoffnung, die Ursachen für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz besser zu verstehen und diese gezielter behandeln zu können.

6 Literaturverzeichnis

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87(2): 171

Antonsson B, Martinou JC (2000) The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 256(1):50-7

Anversa P, Cheng W, Liu Y, Leri A, Redaelli G, Kajstura J (1998) Apoptosis and myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 93 Suppl 3:8-12

Arias J, Alberts AS, Brindle P, Claret FX, Smeal T, Karin M, Feramisco J, Montminy M (1994) Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* 370(6486):226-9

Asai K, Yang GP, Geng YJ, Takagi G, Bishop S, Ishikawa Y, Shannon RP, Wagner TE, Vatner DE, Homcy CJ, Vatner SF (1999) β -adrenergic receptor blockade arrests myocyte damage and preserves cardiac function in the transgenic $G_{s\alpha}$ mouse. *J Clin Invest* 104(5):551-8

Auman HJ, Nottoli T, Lakiza O, Winger Q, Donaldson S, Williams T (2002) Transcription factor AP-2 γ is essential in the extra-embryonic lineages for early postimplantation development. *Development* 129(11):2733-47

Australia/New Zealand Heart Failure Research Collaborative Group (1997) Randomised, placebo-controlled trial of carvedilol in patients with congestive heart failure due to ischaemic heart disease. *Lancet* 349(9049):375-80

Baessler A, Fischer M, Schunkert H (2003) Die chronische Herzinsuffizienz – ein oft vermeidbares Schicksal. *Dtsch Med Wochenschr* 128(27):1489-93

Bannister AJ, Kouzarides T (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384(6610):641-3

Bialik S, Geenen DL, Sasson IE, Cheng R, Horner JW, Evans SM, Lord EM, Koch CJ, Kitsis RN (1997) Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53. *J Clin Invest* 100(6):1363-72

Blendy JA, Kaestner KH, Weinbauer GF, Nieschlag E, Schütz G (1996a) Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene. *Nature* 380(6570):162-5

Blendy JA, Kaestner KH, Schmid W, Gass P, Schütz G (1996b) Targeting of the CREB gene leads to up-regulation of a novel CREB mRNA isoform. *EMBO J* 15(5):1098-106

Böhm M, Gierschik P, Jakobs KH, Pieske B, Schnabel P, Ungerer M, Erdmann E (1990) Increase of $G_{i\alpha}$ in human hearts with dilated but not ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 82(4):1249-65

Böhm M, Reiger B, Schwinger RH, Erdmann E (1994) cAMP concentrations, cAMP dependent protein kinase activity, and phospholamban in non-failing and failing myocardium. *Cardiovasc Res* 28(11):1713-9

Bokník P, Fockenbrock M, Herzig S, Knapp J, Linck B, Lüss H, Müller FU, Müller T, Schmitz W, Schröder F, Neumann J (2000) Protein phosphatase activity is increased in a rat model of long-term beta-adrenergic stimulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362(3):222-31

Borutaite V, Jekabsone A, Morkuniene R, Brown GC (2003) Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cyto-

chrome c release and apoptosis induced by heart ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 35(4):357-66

Bosher JM, Williams T, Hurst HC (1995) The developmentally regulated transcription factor AP-2 is involved in c-erbB-2 overexpression in human mammary carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(3):744-7

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54

Brindle P, Linke S, Montminy M (1993) Protein-kinase-A-dependent activator in transcription factor CREB reveals new role for CREM repressors. *Nature* 364(6440):821-4

Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB (1982) Decreased catecholamine sensitivity and β -adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 307(4):205-11

Bristow MR, Gilbert EM, Abraham WT, Adams KF, Fowler MB, Hershberger RE, Kubo SH, Narahara KA, Ingersoll H, Krueger S, Young S, Shusterman N for the MOCHA Investigators (1996) Carvedilol produces dose-related improvements in left ventricular function and survival in subjects with chronic heart failure. *Circulation* 94(11):2807-16

Buettner R, Kannan P, Imhof A, Bauer R, Yim SO, Glockshuber R, Van Dyke MW, Tainsky MA (1993) An alternatively spliced mRNA from the AP-2 gene encodes a negative regulator of transcriptional activation by AP-2. *Mol Cell Biol* 13(7):4174-85

Buettner R, Moser M, Pscherer A, Imhof A, Bauer R, Hofstaedter F (1994) Molekulare Klonierung eines neuen AP-2 Transkriptionsfaktors, AP-2 β , und seine Funktion in der Zelldifferenzierung. *Verh Dtsch Ges Pathol* 78:38-42

Bourtchuladze R, Frenguelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G, Silva AJ (1994) Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* 79(1):59-68

Carlezon WA Jr, Duman RS, Nestler EJ (2005) The many faces of CREB. *Trends Neurosci* 28(8):436-45

Cerniway RJ, Yang Z, Jacobson MA, Linden J, Matherne GP (2001) Targeted deletion of A₃ adenosine receptors improves tolerance to ischemia-reperfusion injury in mouse myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281(4):H1751-8

Chang HY, Yang X (2000) Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 64(4):821-46

Chapman JG, Magee WP, Stukenbrok HA, Beckius GE, Milici AJ, Tracey WR (2002) A novel nonpeptidic caspase-3/7 inhibitor, (S)-(+)-5-[1-(2-methoxymethylpyrrolidinyl)sulfonyl]isatin reduces myocardial ischemic injury. *Eur J Pharmacol* 456(1-3):59-68

Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH (1993) Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365(6449):855-9

Coats AJ (1998) Is preventive medicine responsible for the increasing prevalence of heart failure? *Lancet* 352 Suppl 1:S139-41

Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB, Rector T (1984) Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 311(13):819-23

Cohn JN, Goldstein SO, Greenberg BH, Lorell BH, Bourge RC, Jaski BE, Gottlieb SO, McGrew F 3rd, DeMets DL, White BG for the Vesnarinone Trial Investigators (1998) A dose-dependent increase in mortality with vesnarinone among patients with severe heart failure. *N Engl J Med* 339(25):1810-6

Comb M, Birnberg NC, Seasholtz A, Herbert E, Goodman HM (1986) A cyclic AMP- and phorbol ester-inducible DNA element. *Nature* 323(6086):353-6

Condorelli G, Roncarati R, Ross J Jr, Pisani A, Stassi G, Todaro M, Trocha S, Drusco A, Gu Y, Russo MA, Frati G, Jones SP, Lefer DJ, Napoli C, Croce CM (2001) Heart-targeted overexpression of caspase3 in mice increases infarct size and depresses cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(17):9977-82

Craig JC, Schumacher MA, Mansoor SE, Farrens DL, Brennan RG, Goodman RH (2001) Consensus and variant cAMP-regulated enhancers have distinct CREB-binding properties. *J Biol Chem* 276(15):11719-28

Daly PA, Sole MJ (1990) Myocardial catecholamines and the pathophysiology of heart failure. *Circulation* 82(2 Suppl):I35-43

Daniel NN, Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116(2):205-19

Danielsen W, v der Leyen H, Meyer W, Neumann J, Schmitz W, Scholz H, Starbatty J, Stein B, Döring V, Kalmár P (1989) Basal and isoprenaline-stimulated cAMP content in failing versus nonfailing human cardiac preparations. *J Cardiovasc Pharmacol* 14(1):171-3

de Groot RP, den Hertog J, Vandenheede JR, Goris J, Sassone-Corsi P (1993) Multiple and cooperative phosphorylation events regulate the CREM activator function. *EMBO J* 12(10):3903-11

Delmas V, Laoide BM, Masquillier D, de Groot RP, Foulkes NS, Sassone-Corsi P (1992) Alternative usage of initiation codons in mRNA encoding the cAMP-responsive-element modulator generates regulators with opposite functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(10):4226-30

El-Armouche A, Zolk O, Rau T, Eschenhagen T (2003) Inhibitory G-proteins and their role in desensitization of the adenylyl cyclase pathway in heart failure. *Cardiovasc Res* 60(3):478-87

Ellis HM, Horvitz HR (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44(6):817-29

Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35(4):495-516

Eschenhagen T, Mende U, Schmitz W, Scholz H, Schulte am Esch J, Sempell R, Warnholtz A, Wüstel JM (1991) β -adrenoceptor stimulation-induced increase in cardiac G_i -protein expression and in carbachol sensitivity. *Eur Heart J* 12 Suppl F:127-31

Eschenhagen T, Mende U, Schmitz W, Scholz H (1992a) Veränderungen der Genexpression bei terminaler Myokardinsuffizienz. *Z Kardiol* 81 Suppl 4:33-40

Eschenhagen T, Mende U, Diederich M, Nose M, Schmitz W, Scholz H, Schulte am Esch J, Warnholtz A, Schäfer H (1992b) Long term β -adrenoceptor-mediated up-regulation of $G_{i\alpha}$ and $G_{o\alpha}$ mRNA levels and pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding proteins in rat heart. *Mol Pharmacol* 42(5):773-83

Feldman AM, Cates AE, Veazey WB, Hershberger RE, Bristow MR, Baughman KL, Baumgartner WA, Van Dop C (1988) Increase of the 40,000-mol wt pertussis toxin substrate (G protein) in the failing human heart. *J Clin Invest* 82(1):189-97

Feng W, Williams T (2003) Cloning and characterization of the mouse AP-2 ϵ gene: a novel family member expressed in the developing olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci* 24(2):460-75

Fentzke RC, Korcarz CE, Lang RM, Lin H, Leiden JM (1998) Dilated cardiomyopathy in transgenic mice expressing a dominant-negative CREB transcription factor in the heart. *J Clin Invest* 101(11):2415-26

Fink JS, Verhave M, Kasper S, Tsukada T, Mandel G, Goodman RH (1988) The CGTCA sequence motif is essential for biological activity of the vasoactive intestinal peptide gene cAMP-regulated enhancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(18):6662-6

Fischer M, Baessler A, Hense HW, Hengstenberg C, Muscholl M, Holmer S, Döring A, Broeckel U, Riegger G, Schunkert H (2003a) Prevalence of left ventricular diastolic dysfunction in the community: Results from a Doppler echocardiographic-based survey of a population sample. *Eur Heart J* 24(4):320-8

Fischer M, Baessler A, Holmer SR, Muscholl M, Bröckel U, Luchner A, Hense HW, Döring A, Riegger G, Schunkert H (2003b) Epidemiologie der linksventrikulären systolischen Dysfunktion in der Allgemeinbevölkerung Deutschlands: Ergebnisse echokardiografischer Untersuchungen einer großen Bevölkerungsstichprobe. *Z Kardiol* 92(4):294-302

Fischer U, Schulze-Osthoff K (2005) New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacol Rev* 57(2):187-215

Foulkes NS, Borrelli E, Sassone-Corsi P (1991) CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell* 64(4):739-49

García MA, Campillos M, Marina A, Valdivieso F, Vázquez J (1999) Transcription factor AP-2 activity is modulated by protein kinase A-mediated phosphorylation. *FEBS Lett* 444(1):27-31

Geng YJ, Ishikawa Y, Vatner DE, Wagner TE, Bishop SP, Vatner SF, Homcy CJ (1999) Apoptosis of cardiac myocytes in $G_{s\alpha}$ transgenic mice. *Circ Res* 84(1):34-42

Gomez L, Chavanis N, Argaud L, Chalabreysse L, Gateau-Roesch O, Ninet J, Ovize M (2005) Fas-independent mitochondrial damage triggers cardiomyocyte death after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(5):H2153-8

Gonzalez GA, Montminy MR (1989) Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59(4):675-80

Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL (1994) Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 94(4):1621-8

Groenning BA, Nilsson JC, Sondergaard L, Fritz-Hansen T, Larsson HB, Hildebrandt PR (2000) Antiremodeling effects on the left ventricle during β -blockade with metoprolol in the treatment of chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 36(7):2072-80

Gustafsson AB, Gottlieb RA (2008) Heart mitochondria: gates of life and death. *Cardiovasc Res* 77(2):334-43

Hai TW, Liu F, Coukos WJ, Green MR (1989) Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers. *Genes Dev* 3(12B):2083-90

Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407(6805): 770-6

Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR (1992) *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356(6369):494-9

Hilger-Eversheim K, Moser M, Schorle H, Buettner R (2000) Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene* 260(1-2):1-12

Hjalmarson A, Goldstein S, Fagerberg B, Wedel H, Waagstein F, Kjekshus J, Wikstrand J, El Allaf D, Vítovec J, Aldershvile J, Halinen M, Dietz R, Neuhaus KL, Jánosi A, Thorgeirsson G, Dunselman PH, Gullestad L, Kuch J, Herlitz J, Rickenbacher P, Ball S, Gottlieb S, Deedwania P for the MERIT-HF Study Group (2000) Effects of controlled-release metoprolol on total mortality, hospitalizations, and well-being in patients with heart failure: The Metoprolol CR/XL Randomized Intervention Trial in congestive heart failure (MERIT-HF). *JAMA* 283(10):1295-302

Ho KK, Anderson KM, Kannel WB, Grossman W, Levy D (1993) Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation* 88(1):107-15

Hoeffler JP, Meyer TE, Yun Y, Jameson JL, Habener JF (1988) Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science* 242(4884):1430-3

Hofstaetter B, Taimor G, Inserte J, Garcia-Dorado D, Piper HM (2002) Inhibition of apoptotic responses after ischemic stress in isolated hearts and cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol* 97(6):479-88

Hoppe UC, Böhm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E (2005) Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. *Z Kardiol* 94(8):488-509

Huang S, Jean D, Luca M, Tainsky MA, Bar-Eli M (1998) Loss of AP-2 results in downregulation of c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis. *EMBO J* 17(15):4358-69

Hummeler E, Cole TJ, Blendy JA, Ganss R, Aguzzi A, Schmid W, Beermann F, Schütz G (1994) Targeted mutation of the CREB gene: compensation within the CREB/ATF family of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(12):5647-51

Imagawa M, Chiu R, Karin M (1987) Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: protein kinase C and cAMP. *Cell* 51(2):251-60

Jones SP, Girod WG, Palazzo AJ, Granger DN, Grisham MB, Jourd'Heuil D, Huang PL, Lefer DJ (1999) Myocardial ischemia-reperfusion injury is exacerbated in absence of endothelial cell nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 276(5 Pt 2):H1567-73

Kang PM, Izumo S (2000) Apoptosis and heart failure: A critical review of the literature. *Circ Res* 86(11):1107-13

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4):239-57

Kim MH, Devlin WH, Das SK, Petrusha J, Montgomery D, Starling MR (1999) Effects of β -adrenergic blocking therapy on left ventricular diastolic relaxation properties in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 100(7):729-35

Kohlbecker A, Lee AE, Schorle H (2002) Exencephaly in a subset of animals heterozygous for AP-2 α mutation. *Teratology* 65(5):213-8

Krebs HA, Henseleit K (1932) Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 210:33-66

Kunapuli S, Rosanio S, Schwarz ER (2006) "How do cardiomyocytes die?" apoptosis and autophagic cell death in cardiac myocytes. *J Card Fail* 12(5):381-91

Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bächinger HP, Brennan RG, Roberts SG, Green MR, Goodman RH (1994) Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370(6486):223-6

Langendorff O (1895) Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Arch Physiol* 61:291-332

Levkau B, Koyama H, Raines EW, Clurman BE, Herren B, Orth K, Roberts JM, Ross R (1998) Cleavage of p21^{Cip1/Waf1} and p27^{Kip1} Mediates Apoptosis in Endothelial Cells through Activation of Cdk2: Role of a Caspase Cascade. *Mol Cell* 1(4):553-63

Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KK, Murabito JM, Vasan RS (2002) Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* 347(18):1397-402

Liao X, Wang X, Gu Y, Chen Q, Chen LY (2005) Involvement of death receptor signaling in mechanical stretch-induced cardiomyocyte apoptosis. *Life Sci* 77(2):160-74

Lim JH, Booker AB, Luo T, Williams T, Furuta Y, Lagutin O, Oliver G, Sargent TD, Fallon JR (2005) AP-2 α selectively regulates fragile X mental retardation-1 gene transcription during embryonic development. *Hum Mol Genet* 14(14):2027-34

Linck B, Bokník P, Baba HA, Eschenhagen T, Haverkamp U, Jäckel E, Jones LR, Kirchhefer U, Knapp J, Lärer S, Müller FU, Schmitz W, Scholz H, Syska A, Vahlensieck U, Neumann J (1998) Long-term beta adrenoceptor-mediated alteration in contractility and expression of phospholamban and sarcoplasmic reticulum Ca⁺⁺-ATPase in mammalian ventricle. *J Pharmacol Exp Ther* 286(1):531-8

Little SA, Kim WK, Mirkes PE (2003) Teratogen-induced activation of caspase-6 and caspase-7 in early postimplantation mouse embryos. *Cell Biol Toxicol* 19(4):215-26

Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89(2):175-84

Löffler G (1998) Transkription und posttranskriptionale Prozessierung der RNA. In: Löffler G, Petrides PE *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, Berlin Heidelberg New York Barcelona Budapest Hongkong London Mailand Paris Singapur Tokio, 6. Aufl. S 239-62

Lowes BD, Gill EA, Abraham WT, Larrain JR, Robertson AD, Bristow MR, Gilbert EM (1999) Effects of carvedilol on left ventricular mass, chamber ge-

ometry, and mitral regurgitation in chronic heart failure. *Am J Cardiol* 83(8):1201-5

Maldonado R, Smadja C, Mazzucchelli C, Sassone-Corsi P (1999) Altered emotional and locomotor responses in mice deficient in the transcription factor CREM. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(24):14094-9

Mantamadiotis T, Lemberger T, Bleckmann SC, Kern H, Kretz O, Martin Villalba A, Tronche F, Kellendonk C, Gau D, Kapfhammer J, Otto C, Schmid W, Schütz G (2002) Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nat Genet* 31(1):47-54

Matus M, Lewin G, Stümpel F, Buchwalow IB, Schneider MD, Schütz G, Schmitz W, Müller FU (2007) Cardiomyocyte-specific inactivation of transcription factor CREB in mice. *FASEB J* 21(8):1884-92

Mayr B, Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(8):599-609

McKeon F (1991) Nuclear lamin proteins: domains required for nuclear targeting, assembly, and cell-cycle-regulated dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 3(1):82-6

Mende U, Eschenhagen T, Geertz B, Schmitz W, Scholz H, Schulte am Esch J, Sempell R, Steinfath M (1992) Isoprenaline-induced increase in the 40/41 kDa pertussis toxin substrates and functional consequences on contractile response in rat heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 345(1):44-50

Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, Hawkins HK, Berens K, Ballantyne CM (1995) Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol* 269(6 Pt 2):H2147-54

Mirkes PE (2002) 2001 Warkany Lecture: To Die or Not to Die, the Role of Apoptosis in Normal and Abnormal Mammalian Development. *Teratology* 65(5):228-39

Mitchell PJ, Wang C, Tjian R (1987) Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen. *Cell* 50(6):847-61

Mittmann C, Eschenhagen T, Scholz H (1998) Cellular and molecular aspects of contractile dysfunction in heart failure. *Cardiovasc Res* 39(2):267-75

Mohibullah N, Donner A, Ippolito JA, Williams T (1999) SELEX and missing phosphate contact analyses reveal flexibility within the AP-2 α protein: DNA binding complex. *Nucleic Acids Res* 27(13):2760-9

Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P (1993) Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* 75(5):875-86

Montminy MR, Sevarino KA, Wagner JA, Mandel G, Goodman RH (1986) Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(18):6682-6

Moser M, Pscherer A, Roth C, Becker J, Mücher G, Zerres K, Dixkens C, Weis J, Guay-Woodford L, Buettner R, Fässler R (1997) Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cells in mice lacking transcription factor AP-2 β . *Genes Dev* 11(15):1938-48

Müller FU, Bokník P, Horst A, Knapp J, Linck B, Schmitz W, Vahlensieck U, Böhm M, Deng MC, Scheld HH (1995) cAMP response element binding protein is expressed and phosphorylated in the human heart. *Circulation* 92(8):2041-3

Müller FU, Bokník P, Knapp J, Lüss H, Neumann J, Vahlensieck U, Böhm M, Deng MC, Scheld HH, Schmitz W (1997) Quantification of the cAMP response element binding protein in ventricular nuclear protein from failing and nonfailing human hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 236(2):351-4

Müller FU, Bokník P, Knapp J, Neumann J, Vahlensieck U, Oetjen E, Scheld HH, Schmitz W (1998) Identification and expression of a novel isoform of cAMP response element modulator in the human heart. *FASEB J* 12(12):1191-9

Müller FU, Neumann J, Schmitz W (2000) Transcriptional regulation by cAMP in the heart. *Mol Cell Biochem* 212(1-2):11-7

Müller FU, Lewin G, Matus M, Neumann J, Riemann B, Wistuba J, Schütz G, Schmitz W (2003) Impaired cardiac contraction and relaxation and decreased expression of sarcoplasmic Ca^{2+} -ATPase in mice lacking the CREM gene. *FASEB J* 17(1):103-5

Müller FU, Loser K, Kleideiter U, Neumann J, von Wallbrunn C, Dobner T, Scheld HH, Bantel H, Engels IH, Schulze-Osthoff K, Schmitz W (2004) Transcription factor AP-2 α triggers apoptosis in cardiac myocytes. *Cell Death Differ* 11(5):485-93

Müller FU, Lewin G, Baba HA, Bokník P, Fabritz L, Kirchhefer U, Kirchhof P, Loser K, Matus M, Neumann J, Riemann B, Schmitz W (2005) Heart-directed expression of a human cardiac isoform of cAMP-response element modulator in transgenic mice. *J Biol Chem* 280(8):6906-14

Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM (1998) An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273(5):2926-30

Nakamura T, Ueda Y, Juan Y, Katsuda S, Takahashi H, Koh E (2000) Fas-mediated apoptosis in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats: In vivo study. *Circulation* 102(5):572-8

Nantel F, Monaco L, Foulkes NS, Masquillier D, LeMeur M, Henriksen K, Dierich A, Parvinen M, Sassone-Corsi P (1996) Spermiogenesis deficiency and germ-cell apoptosis in CREM-mutant mice. *Nature* 380(6570):159-62

Narula J, Haider N, Arbustini E, Chandrashekar Y (2006) Mechanisms of disease: apoptosis in heart failure – seeing hope in death. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3(12):681-8

Neumann J, Schmitz W, Scholz H, von Meyerinck L, Döring V, Kalmar P (1988) Increase in myocardial G_i-proteins in heart failure. *Lancet* 2(8617):936-7

Nony P, Boissel JP, Lievre M, Leizorovicz A, Haugh MC, Fareh S, de Breyne B (1994) Evaluation of the effect of phosphodiesterase inhibitors on mortality in chronic heart failure patients. A meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol* 46(3):191-6

O'Connor CM, Gattis WA, Uretsky BF, Adams KF Jr, McNulty SE, Grossman SH, McKenna WJ, Zannad F, Swedberg K, Gheorghiade M, Califf RM (1999) Continuous intravenous dobutamine is associated with an increased risk of death in patients with advanced heart failure: Insights from the Flolan International Randomized Survival Trial (FIRST). *Am Heart J* 138(1 Pt 1):78-86

Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87(5):953-9

Oulad-Abdelghani M, Bouillet P, Chazaud C, Dollé P, Chambon P (1996) AP-2.2: a novel AP-2-related transcription factor induced by retinoic acid during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Exp Cell Res* 225(2):338-47

Packer M, Carver JR, Rodeheffer RJ, Ivanhoe RJ, DiBianco R, Zeldis SM, Hendrix GH, Bommer WJ, Elkayam U, Kukin ML et al. (1991) Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group. *N Engl J Med* 325(21):1468-75

Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, Shusterman NH for the U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group (1996a) The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. *N Engl J Med* 334(21):1349-55

Packer M, Colucci WS, Sackner-Bernstein JD, Liang CS, Goldscher DA, Freeman I, Kukin ML, Kinhal V, Udelson JE, Klapholz M, Gottlieb SS, Pearle D, Cody RJ, Gregory JJ, Kantrowitz NE, LeJemtel TH, Young ST, Lukas MA, Shusterman NH for the PRECISE Study Group (1996b) Double-blind, placebo-controlled study of the effects of carvedilol in patients with moderate to severe heart failure. *Circulation* 94(11):2793-9

Packer M, Coats AJ, Fowler MB, Katus HA, Krum H, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Castaigne A, Roecker EB, Schultz MK, DeMets DL for the Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival Study Group (2001) Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 344(22):1651-8

Parker D, Ferreri K, Nakajima T, LaMorte VJ, Evans R, Koerber SC, Hoeger C, Montminy MR (1996) Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. *Mol Cell Biol* 16(2):694-703

Quinn PG (1993) Distinct activation domains within cAMP response element-binding protein (CREB) mediate basal and cAMP-stimulated transcription. *J Biol Chem* 268(23):16999-7009

Rao L, Perez D, White E (1996) Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 135(6 Pt 1):1441-55

Regula KM, Kirshenbaum LA (2005) Apoptosis of ventricular myocytes: a means to an end. *J Mol Cell Cardiol* 38(1):3-13

Rudolph D, Tafuri A, Gass P, Hämmerling GJ, Arnold B, Schütz G (1998) Impaired fetal T cell development and perinatal lethality in mice lacking the cAMP response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(8):4481-6

Sakahira H, Enari M, Nagata S (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391(6662):96-9

Sauer B (1998) Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* 14(4):381-92

Schmitz W, Scholz H, Erdmann E (1987) Effects of α - and β -adrenergic agonists, phosphodiesterase inhibitors and adenosine on isolated human heart muscle preparations. *Trends Pharmacol Sci* 8(11):447-50

Schmitz W, Boknik P, Linck B, Müller FU (1996) Adrenergic and muscarinic receptor regulation and therapeutic implications in heart failure. *Mol Cell Biochem* 157(1-2):251-8

Schorle H, Meier P, Buchert M, Jaenisch R, Mitchell PJ (1996) Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature* 381(6579):235-8

Scorrano L, Korsmeyer SJ (2003) Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* 304(3):437-44

Short JM, Wynshaw-Boris A, Short HP, Hanson RW (1986) Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) promoter-regulatory region. II. Identification of cAMP and glucocorticoid regulatory domains. *J Biol Chem* 261(21):9721-6

Sigmund M, Jakob H, Becker H, Hanrath P, Schumacher C, Eschenhagen T, Schmitz W, Scholz H, Steinfath M (1996) Effects of metoprolol on myocardial β -adrenoceptors and $G_{i\alpha}$ -proteins in patients with congestive heart failure. *Eur J Clin Pharmacol* 51(2):127-32

Sinoway LS, Maskin CS, Chadwick B, Forman R, Sonnenblick EH, Le Jemtel TH (1983) Long-term therapy with a new cardiotoxic agent, WIN 47203: drug-dependent improvement in cardiac performance and progression of the underlying disease. *J Am Coll Cardiol* 2(2):327-31

Smaili SS, Hsu YT, Carvalho AC, Rosenstock TR, Sharpe JC, Youle RJ (2003) Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. *Braz J Med Biol Res* 36(2):183-90

Sumeray MS, Yellon DM (1998) Characterisation and validation of a murine model of global ischaemia-reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 186(1-2):61-8

Takahashi A, Alnemri ES, Lazebnik YA, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Moir RD, Goldman RD, Poirier GG, Kaufmann SH, Earnshaw WC (1996) Cleavage of lamin A by Mch2 α but not CPP32: multiple interleukin 1 β -converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(16):8395-400

Takemori H, Kajimura J, Okamoto M (2007) TORC-SIK cascade regulates CREB activity through the basic leucine zipper domain. *FEBS J* 274(13):3202-9

Tomita H, Nazmy M, Kajimoto K, Yehia G, Molina CA, Sadoshima J (2003) Inducible cAMP early repressor (ICER) is a negative-feedback regulator of cardiac hypertrophy and an important mediator of cardiac myocyte apoptosis in response to beta-adrenergic receptor stimulation. *Circ Res* 93(1):12-22

Uretsky BF, Jessup M, Konstam MA, Dec GW, Leier CV, Benotti J, Murali S, Herrmann HC, Sandberg JA for the Enoximone Multicenter Trial Group (1990) Multicenter trial of oral enoximone in patients with moderate to moderately severe congestive heart failure. Lack of benefit compared with placebo. *Circulation* 82(3):774-80

van Empel VP, Bertrand AT, Hofstra L, Crijns HJ, Doevendans PA, De Windt LJ (2005) Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovasc Res* 67(1):21-9

Vaux DL, Cory S, Adams JM (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335(6189):440-2

von Harsdorf R, Li PF, Dietz R (1999) Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation* 99(22):2934-41

Walker WH, Girardet C, Habener JF (1996) Alternative exon splicing controls a translational switch from activator to repressor isoforms of transcription factor CREB during spermatogenesis. *J Biol Chem* 271(33):20145-1050

Wang G, Yeh HI, Lin JJ (1994) Characterization of cis-regulating elements and trans-activating factors of the rat cardiac troponin T gene. *J Biol Chem* 269(48):30595-603

Weinstein LS, Spiegel AM, Carter AD (1988) Cloning and characterization of the human gene for the α -subunit of G_{12} , a GTP-binding signal transduction protein. *FEBS Lett* 232(2):333-40

Williams T, Tjian R (1991a) Characterization of a dimerization motif in AP-2 and its function in heterologous DNA-binding proteins. *Science* 251(4997):1067-71

Williams T, Tjian R (1991b) Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. *Genes Dev* 5(4):670-82

Wu S, Ko YS, Teng MS, Ko YL, Hsu LA, Hsueh C, Chou YY, Liew CC, Lee YS (2002) Adriamycin-induced cardiomyocyte and endothelial cell apoptosis: in vitro and in vivo studies. *J Mol Cell Cardiol* 34(12):1595-607

Wyllie AH (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284(5756):555-6

The Xamoterol in Severe Heart Failure Study Group (1990) Xamoterol in severe heart failure. *Lancet* 336(8706):1-6

Yamamoto KK, Gonzalez GA, Biggs WH 3rd, Montminy MR (1988) Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* 334(6182):494-8

Yamaoka M, Yamaguchi S, Suzuki T, Okuyama M, Nitobe J, Nakamura N, Mitsui Y, Tomoike H (2000) Apoptosis in rat cardiac myocytes induced by Fas ligand: priming for Fas-mediated apoptosis with doxorubicin. *J Mol Cell Cardiol* 32(6):881-9

Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell* 75(4): 641-52

Zhang J, Hagopian-Donaldson S, Serbedzija G, Elsemore J, Plehn-Dujowich D, McMahon AP, Flavell RA, Williams T (1996) Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. *Nature* 381(6579):238-41

Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canettieri G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolsheimer E, Jacobsen E, Kadam S, Ecker JR, Emerson B, Hogenesch JB, Unterman T, Young RA, Montminy M (2005) Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(12):4459-64

Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, Wilcox JN, Shearer S, Ronson RS, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2000) Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res* 45(3):651-60

Zhao F, Satoda M, Licht JD, Hayashizaki Y, Gelb BD (2001) Cloning and characterization of a novel mouse AP-2 transcription factor, AP-2 δ , with unique DNA binding and transactivation properties. *J Biol Chem* 276(44):40755-60

Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90(3):405-13

7 Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
AP-2	Activator Protein 2
Apaf-1	Apoptosis protease activating factor 1
ATF1	Activating Transcription Factor 1
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2 associated x protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2-Protein
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i> (ein Rund- oder Fadenwurm)
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAD	Caspase-aktivierte DNase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB Binding Protein
<i>ced</i>	Cell death (Zelltod)-Gen aus <i>C. elegans</i>
c-erbB-2	Human epidermal growth factor receptor 2 (humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2)
c-KIT	c-Kit-Rezeptor (Stammzelleffektorrezeptor)
CO ₂	Kohlendioxid
CRE	cAMP Response Element
Cre	“causes recombination” (Cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1)
CREB	cAMP Response Element Binding Protein
CREM	cAMP Response Element Modulator
CSQ	Calsequestrin
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol

ECL	Enhanced Chemoluminescence (verstärkte Chemolumineszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-tetraacetat
FADD	Fas Associated Death Domain
Fas	TNF receptor superfamily, member 6
FasL	Fas-Ligand
<i>Fmr1</i>	Fragile X mental retardation 1-Gen
G _i	inhibitorisches GTP-bindendes Protein
G _s	stimulierendes GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
H ₂ O ₂	Wasserstoffsuperoxid
HCl	Chlorwasserstoff/Salzsäure
Hepes	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells (humane Umbilikalvenen-Endothelzellen)
ICAD	Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase
ICE	Interleukin Converting Enzyme (Interleukin-Konversionsenzym)
ICER	Inducible cAMP Early Repressor
IgG	Immunglobulin G
K ⁺	Kalium-Ion
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KID	Kinase-induzierbare Domäne
KO	knockout (außer Gefecht setzen, abschalten)
<i>LacZ</i>	β-Galactosidase-Gen aus Escherichia coli
<i>loxP</i>	Locus of X-over of P1
M	molar

m/V	Masse pro Volumen
MCAM/MUC18	Melanoma Cell Adhesion Molecule (Melanom-Zell-adhäsionsmolekül)
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
Na ⁺	Natrium-Ion
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
<i>neo</i>	Neomycin-Resistenzgen
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid-Anion
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
pH	potentia Hydrogenii („Wasserstoffkraft“) pH = -log ₁₀ ([H ₃ O ⁺])
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RLU	Relative Luminescence Units (relative Lumineszenzeinheiten)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RU	Relative Units (relative Einheiten)

s	Sekunden
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TE	TRIS-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TORC	Transducer Of Regulated CREB Activity Coactivator
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
WT	Wildtyp

8 Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz danke ich für die freundliche Aufnahme in das Institut, so dass ich vom ersten Tag an das Gefühl hatte, dazu zu gehören, sowie für seine wertvollen Tipps, seine motivierende Kritik und die stets wohlwollende Unterstützung in allen Phasen meiner Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Frank Ulrich Müller für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und seine außerordentlich engagierte, anspornende und hilfsbereite Betreuung, bei der es zu jeder Zeit möglich war, mit meinen Fragen „an seine Tür zu klopfen“, und die ganz maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Frau Dr. rer. nat. Geertje Lewin und Herrn Dr. rer. nat. Christian von Wallbrunn danke ich für ihre vielfältigen Hilfestellungen beim Erlernen der molekularbiologischen und biochemischen Arbeitsmethoden, sowie für ihre freundschaftliche Begleitung meiner Anfänge im Labor.

Frau Nicole Hinsenhofen und Frau Dr. med. Sevdalina Yurukova danke ich für ihre Hilfe beim Erlernen der Langendorff-Methode.

Herrn Dietrich Hübner und Herrn Ulrich Breuer danke ich für die Konstruktion der Langendorff-Apparatur und dafür, dass sie bei auftretenden technischen Problemen immer innerhalb kürzester Zeit mit einer Lösung bereit standen.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Bodo Levkau und seinen Mitarbeiterinnen Frau Kerstin Abou Hamed, Frau Dr. rer. nat. Andrea Sokoll und Frau Dr. rer. nat. Solveig Söding danke ich für ihre Tipps und Tricks bei der Etablierung meiner Proteinnachweise und für die Möglichkeit, diese in ihrem Labor durchzuführen.

Allen hier namentlich nicht genannten Kolleginnen und Kollegen aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie danke ich für das angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima, in dem ich mich von Anfang an sehr wohl gefühlt habe.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern Ursula und Leo Stümpel, die mich, seit ich mich erinnern kann, bei allen meinen Plänen und Zielen nach Kräften unterstützt und mir stets Rückhalt gegeben haben.

9 Lebenslauf