

Aus der Molekularen Kardiologie des Zentrums Innere Medizin
am Klinikum der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität
Frankfurt am Main

**Untersuchung der Apoptose
in kardialen und kardiovaskulären
Erkrankungen:
Bedeutung von Stickstoffmonoxid.**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
am Fachbereich Ernährungs- und Haushaltswissenschaften der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Dipl. oec. troph. Ulrike Weiland
aus Marburg-Wehrda
im Mai 1999

Meinen Eltern gewidmet

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.1999

Vorsitzender: Prof. Dr. P. M. Schmitz
1. Gutachterin: Prof. Dr. H. Daniel
2. Gutachter: Prof. Dr. A. M. Zeiher
Prüfer: Prof. Dr. O. Walz
Prof. Dr. M. Neuhäuser-Berthold

DANKSAGUNG

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt:

■ Frau Prof. Dr. Hannelore Daniel für die Vertretung meiner Arbeit im Fachbereich 19 (Ernährungs- und Haushaltswissenschaften) der Justus-Liebig-Universität Gießen.

■ Herrn Prof. Andreas M. Zeiher für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des (auch finanziell) sehr gut ausgestatteten Arbeitsplatzes, für die Finanzierung meiner Doktorandenstelle und die konstruktive Kritik in zahlreichen Laborseminaren.

■ Frau PD Dr. Stefanie Dimmeler für ihre stete Diskussionsbereitschaft sowie für die wissenschaftliche und breitgefächerte methodische Ausbildung.

■ Herrn Dr. Christian Ihling, Institut für Pathologie der Universität Freiburg für die Zusammenarbeit in der Immunhistochemie.

■ Herrn Dr. U. Albus, Herrn Dr. W. Scholz, Herrn Dr. H. Rütten (alle CV Research, Hoechst Marion Roussel in Frankfurt/M.), Herrn Dr. Thomas Stadlbauer und Herrn Dr. Frank Jung für die Zusammenarbeit bei den Tierversuchen.

■ Herrn Dr. Michael Nehls und Frau Dr. Uta Matysiak-Scholze für meine molekularbiologische „Grundausbildung“.

■ Allen Laborkollegen für die gute Arbeitsatmosphäre und Unterstützung: Meinen Mitdoktorandinnen Dr. Judith Haendeler, Dipl. Biol. Corinna Hermann und Dipl. Biol. Carmen Urbich für Motivation, Diskussion und gemeinsam verbrachte abendliche Unternehmungen. Meike Stahmer, Christine Göbel und Susanne Ficus für die hervorragende technische Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

■ der Forschungsreferentin Frau Dr. Gießler (des FB Medizin der Johann-Wolfgang-Goethe Universität) für die Bereitstellung des großzügigen Reisestipendiums zum „71th Scientific meeting“ der American Heart Association im Nov. 1998 in Dallas, USA.

■ Frau Meike Stahmer und insbesondere meinem Freund Michael Kagerhuber, die mir in schwierigen Zeiten stets aufmunternd zur Seite standen.

Mai 1999, Ulrike Weiland

Apoptosis in cardiac and cardiovascular diseases: Involvement of nitric oxide

Ulrike Weiland

Betreuer: Prof. Dr. Hannelore Daniel, Technical University of Munich

Prof. Dr. Andreas M. Zeiher, University of Frankfurt/M.

Key words: nutritional sciences, biochemistry, apoptosis, cardiac and cardiovascular diseases, nitric oxide

Apoptosis is a distinct form of cell death that has been under intensive investigations in the past few years. Many signalling pathways were elucidated in cell-free systems or in intact cells. But only little is known about apoptosis in cardiac and cardiovascular diseases. Therefore, the aim of this study was to investigate apoptosis in various cardiac diseases: in hyperlipidemia induced atherosclerosis, in acute rejected heart transplants, in ischemia and reperfusion as well as in chronic hypoxia.

Atherosclerosis is the main contributor to myocardial infarction. Also hyperlipidemia is a known major risk factor.

To investigate apoptosis in **hyperlipidemia induced atherosclerosis**, genetically induced hyperlipidemia in FfH Heritable Hypercholesterolemic Rabbits (FFH, n=8) was compared with New Zealand White rabbits either fed with a cholesterol diet (H, n=8, 0,25% cholesterol, 3% coconut oil) or with a normal diet (control, n=5) for 12 weeks. To determine apoptosis DNA-laddering and immunohistochemical TUNEL-stainings were performed. In advanced fibrous plaques of FFH rabbits apoptosis of vascular smooth muscle cells (VSMCs) and macrophages (Mφs) correlated with a drastic 18-fold increased expression of proapoptotic Bax. The antiapoptotic protein Bcl-2 remained unchanged. In conclusion, apoptosis in advanced plaques seems to be a double edged sword: apoptosis of VSMCs may lead to plaque rupture due to diminished collagen synthesis and following myocardial infarction. In contrast, apoptosis of Mφ could induce plaque stabilisation.

Cholesterol diet did not induce morphological changes of the aortas in spite of elevated serum cholesterol. A doubling of Bax expression was observed in endothelial cells, indicating the induction of apoptosis in this cell type. Apoptosis of endothelial cells could be an initial manifestation leading to endothelial dysfunction and subsequent plaque development. The increased expression of Bax seems to correlate with elevated Low Density Lipoprotein (LDL) levels in both models underlining the induction of apoptosis by elevated serum LDL.

Heart transplantation is a common therapeutical option in the terminal stages of heart failure. The most important complications are acute rejection and chronic vasculopathy of the transplants.

To investigate apoptosis as an effector mechanism of **acute rejection**, the model of **allogenic heart transplantation** from Wistar Furth to Lewis rats (n = 15) was used. These hearts were rejected from 6 to 10 days after transplantation. Apoptosis in acute rejected heart transplants was characterised by an enhanced (3-fold) expression of Bax. Bcl-2 was completely degraded into a specific degradation product of about 17 kD. An RNase protection assay with multiple probes revealed no transcriptional changes of mRNA levels in acute rejected compared to control hearts. The posttranscriptional degradation of Bcl-2 was further analysed in a radioactive assay in vitro. The involvement of a serine protease which is sensitive to nitric oxide (NO) and dithiotreitol (DTT) was elucidated. Apoptosis and in particular the elevated ratio of proapoptotic Bax to antiapoptotic Bcl-2 could be responsible for transplant rejection. In addition, the degradation of Bcl-2 could also contribute to transplant rejection probably due to diminished antiapoptotic Bcl-2 levels or by producing an apoptotic degradation fragment.

Myocardial infarction is either a consequence of atherosclerotic vessel occlusion or of transplantation. Typically it is accompanied by a loss of cardiomyocytes. Ischemia/reperfusion is an accepted model for myocardial infarction.

To investigate apoptosis in **ischemia/reperfusion**, hearts from male Wistar Furth rats were perfused ex vivo in a Langendorff apparatus (n=6 per group; 30 minutes equilibration, 30 min. global ischemia, 30 min. reperfusion). Reperfusion, but not ischemia alone induced apoptosis. Apoptosis was accompanied by the activation of caspase-3, a member of the apoptosis inducing caspase-cascade (as determined by western blotting and a radioactive assay in vitro).

In contrast to acute hypoxia in ischemia, **chronic hypoxia** in Wistar Furth rats (21 days 10% O₂, n=4) resulted in apoptosis of the hearts which was characterised by a doubling of proapoptotic Bax and a half-fold reduction of antiapoptotic Bcl-2. Thus the enhanced ratio of Bax to Bcl-2 could be responsible for apoptosis in chronic hypoxia.

Myocardial diseases are often accompanied by a reduction of endogenous nitric oxide. The role of nitric oxide in apoptosis is discussed controversially.

The physiological relevance of **antiapoptotic NO-effects** was demonstrated in ischemia/reperfusion experiments. Inhibiting the endogenous NO-synthase in **ischemia/reperfusion** with its competitive inhibitor L-N^G-Monomethyl-L-arginine (LNMMA, 1 mM) potentiated

apoptosis. In addition, caspase-3 was activated suggesting protective effects of the endogenous NO production due to an inhibiting interference with caspase-3.

These results were underlined by the observations that hearts of **endothelial nitric oxide synthase (eNOS)-knockout-mice** (n=2 per group) showed apoptosis, which correlated with an elevated Bax expression.

All taken together, apoptosis was demonstrated in all models under investigation. Apoptosis shows specific characteristic features in the distinct cardiac/cardiovascular diseases providing future targets for prevention and therapy.

Proatherosclerotic and proinflammatory factors are known to inhibit endogenous NO release. Therefore, the regulation of eNOS protein synthesis in response to tumour necrosis factor α (TNF α) in the presence of cycloheximide (CHX, an inhibitor of protein synthesis) was analysed in human umbilical vein endothelial cell cultures (HUVEC). The apoptotic stimuli TNF α /CHX resulted in the proteolysis of eNOS. The diminished eNOS protein levels were accompanied by a reduced enzyme activity suggesting an antiapoptotic function of the endogenous NO synthesis. Inhibition of the proteasome with ZLLLH, a proteasome-specific inhibitor, only reversed eNOS proteolysis induced by TNF α /CHX indicating the involvement of a protein which is interacting with eNOS. eNOS itself seems not to be degraded by the proteasome, because ZLLLH had no effect on TNF α induced degradation. In conclusion, these results suggest the presence of a protective eNOS associated protein which is degraded by TNF/CHX leading to a subsequent degradation of eNOS. The chaperone Hsp90 could be such an eNOS interacting protein. However, in our system we could not observe a significant role of HSP70 or Caveolin-1 in eNOS degradation. Immunoprecipitation studies revealed the involvement of an eNOS interacting protein of around 70 kD molecular weight. This protein has still to be identified.

In summary, nitric oxide, especially derived from eNOS, seems to be protective against apoptotic cell death. Elucidating the mechanisms leading to a decreased NO production by the eNOS could help to explain pathological disorders of the cardiovascular biology.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	X
1 EINLEITUNG	1
1.1 Signaltransduktion der Apoptose	5
1.2 Stickstoffmonoxid, NO-Synthasen und Apoptose	10
2 PROBLEMSTELLUNG	13
3 MATERIAL UND METHODEN	14
3.1 Tiermodelle	14
3.1.1 Haltung der Tiere	14
3.1.2 Genetische- und Fütterungsinduzierte Hyperlipidämie in Kaninchen	14
3.1.3 Akute Abstoßung in der allogenen Herztransplantation an Ratten	15
3.1.4 Ischämie und Reperfusion in Rattenherzen (Langendorff-Apparatur)	15
3.1.5 Hypoxie im Ganztiermodell an Ratten und Knockout-Mäusen	17
3.2 Zellkultur	17
3.2.1 Humane Venöse Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC)	17
3.2.2 Jurkat-Zellen	18
3.3 Apoptose-Nachweise	18
3.3.1 Nachweis der DNA-Fragmentierung in Gesamt-DNA (<i>DNA-Leiter</i>)	18
3.3.1.1 DNA-Isolation aus Tierorganen	18
3.3.1.2 Radioaktive Markierung der DNA-Fragmente	19
3.3.2 Immunhistochemischer <i>In situ</i> -Apoptosenachweis: <u>T</u> erminale-Deoxy-nucleotidyl-Transferase-mediertes d <u>U</u> TP <u>N</u> ick- <u>E</u> nd <u>L</u> abeling (<i>TUNEL</i>)	19
3.4 Immunhistochemie	20
3.4.1 Doppelfärbung: TUNEL und Oberflächenmarker für VSMC/Makrophagen	20
3.4.2 Doppelfärbung: Bax und Oberflächenmarker für VSMC/Makrophagen	20
3.5 Bestimmung von Serumlipiden	21
3.5.1 Bestimmung des Gesamtcholesterins im Serum	21

3.5.2 Bestimmung der Lipoproteine im Serum	21
3.5.3 Bestimmung der Triglyceride im Serum	21
3.6 Methoden zur Analyse von Proteinen	22
3.6.1 Isolation von Proteinen	22
3.6.1.1 aus Gewebe	22
3.6.1.2 aus Zellen	22
3.6.2 Trichloressigsäure (TCA)-Fällung von Proteinen	22
3.6.3 Immunpräzipitation aus Zell-Lysaten	22
3.6.4 Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen	23
3.6.5 Silberfärbung	23
3.6.6 Transfer von Proteinen (Western Blot)	24
3.6.6.1 Semidry-Blotting (für Proteine < 50 kD)	24
3.6.6.2 Wet-Blotting (für Proteine > 50 kD)	24
3.6.7 Immunfärbung von Western Blots	25
3.7 RNA-Isolation aus Gewebe und Ribonuclease Protection Assay	26
3.7.1 RNA-Isolation aus Gewebe	26
3.7.2 RNase-Protection-Assay (RPA)	26
3.8 Plasmidpräparation aus Bakterien	28
3.8.1 Herstellung CaCl ₂ -kompetenter Bakterien	28
3.8.2 Transformation von TG-1	28
3.8.3 Bakterienkultur zur Vermehrung der Plasmid-DNA und Plasmid-DNA- Präparation	29
3.9 In vitro-Transkription und Translation von Proteinen	29
3.10 In vitro-Degradationsassay radioaktiv markierter Proteine	30
3.10.1 In vitro-Degradation von [³⁵ S]-Bcl-2	30
3.10.2 In vitro-Proteolyse von [³⁵ S]-Caspase-3	30
3.10.3 In vitro-Degradation von eNOS (nicht radioaktiv)	31
3.11 Indirekte Bestimmung der eNOS-Enzymaktivität (Messung der cGMP- Akkumulation)	31
3.11.1 Behandlung und Aufarbeitung der Zellen (HUVEC)	31
3.11.2 cGMP Enzymimmunoassay (EIA)	32
3.12 Statistische Auswertung	32

4	ERGEBNISSE	33
4.A	Untersuchungen zur Apoptose in der Pathogenese kardialer und kardiovaskulären Erkrankungen	33
4.1	Bedeutung der Apoptose in der Hyperlipidämie	33
4.1.1	Plaques-Entwicklung in genetisch und fütterungsinduzierter Hyperlipidämie	33
4.1.2	Apoptose in der Hyperlipidämie	34
4.1.2.1	Immunhistochemische Identifizierung TUNEL-positiver Zellen in genetisch induzierter Hyperlipidämie	37
4.1.3	Regulation von Bax, Bcl-2 und p53	38
4.1.3.1	Nachweis der Regulation von Bax und Bcl-2-Protein im Western Blot	38
4.1.3.2	Immunhistochemische Identifizierung Bax-positiver Zellen	40
4.1.4	Serumlipide in genetisch und fütterungsinduzierter Hyperlipidämie	42
4.2	Apoptose in der akuten Abstoßung von allogenen Herztransplantaten	43
4.2.1	Nachweis der Beteiligung von Apoptose	44
4.2.2	Regulation von Bax und Bcl-2	46
4.2.2.1	Regulation von Bax-Protein	46
4.2.2.2	Zeitabhängige Regulation von Bcl-2-Protein	46
4.2.2.3	Einfluß auf die Bcl-2 Protein mRNA-Expression	47
4.2.2.4	Charakterisierung der Bcl-2 Degradation	49
4.3	Untersuchung der Apoptose in Ischämie/Reperfusion	56
4.3.1	Apoptose in Ischämie/Reperfusion	56
4.3.2	Bedeutung von endogenem NO auf Ischämie/Reperfusion-induzierte Apoptose	58
4.3.3	Bedeutung von Bcl-2 und Bax	59
4.3.4	Bedeutung der Caspase-3 in der Ischämie/Reperfusion-induzierten Apoptose	60
4.3.4.1	Nachweis der proteolytischen Spaltung von Caspase-3 im Western Blot	61
4.3.4.2	Nachweis der endogenen Caspase-Spaltungsaktivität	62
4.4	Untersuchung der Apoptose in der Hypoxie	63
4.4.1	Apoptose in der Hypoxie im Rattenmodell	63
4.4.1.1	Nachweis der Apoptose	64
4.4.1.2	Regulation von Bax, Bcl-2 und p53	64
4.4.2	Apoptose in der Hypoxie im Mausmodell	65
4.4.2.1	Untersuchung der Apoptose in Wildtypmäusen	66

4.4.2.1.1 Nachweis der Apoptose in der Hypoxie in Wildtypmäusen	66
4.4.2.1.2 Regulation von Bax und Bcl-2 in Wildtypmäusen	67
4.4.2.2 Untersuchung der Apoptose in NO-Synthase-Knockout-Mäusen	67
4.4.2.2.1 Nachweis der Apoptose in NOS-Knockout-Mäusen	68
4.4.2.2.2 Regulation von Bax und Bcl-2 in NO-Synthase-Knockout-Mäusen	69
4.4.2.3 Regulation der eNOS in NOS-Knockout-Mäusen	70
4.B In vitro-Charakterisierung der TNF/CHX-induzierten Degradation der endothelialen NO-Synthase (eNOS)	72
4.5.1 Einfluß von Proteasomenkomplex-Inhibitoren auf die eNOS-Degradation in HUVEC	72
4.5.2 Einfluß von Proteasomenkomplex-Inhibitoren auf die eNOS-Degradation <i>in vitro</i>	74
4.5.3 Einfluß der TNF/CHX-induzierten eNOS-Degradation auf die eNOS-Aktivität	76
4.5.4 Bedeutung von interagierenden Proteinen auf die eNOS-Proteolyse	77
4.5.4.1 Einfluß von TNF/CHX auf Heat-Shock-Proteine	78
4.5.4.2 Einfluß von TNF/CHX auf Caveolin-1	80
5 DISKUSSION	81
5.1 Apoptose in kardialen Erkrankungen	81
5.1.1 Apoptose in der Hyperlipidämie	81
5.1.2 Apoptose in der akuten Abstoßung	85
5.1.3 Apoptose in Ischämie und Reperfusion	88
5.1.4 Bedeutung von NO auf die Apoptose in Ischämie und Reperfusion	89
5.1.5 Bedeutung der Apoptose in der Hypoxie	90
5.1.6 Bedeutung der Apoptose in NO-Synthase-Knockout-Mäusen	92
5.1.7 Zusammenfassung: Apoptose in kardialen und kardiovaskulären Erkrankungen	93
5.2 TNF-α induzierte Degradation der eNOS in HUVEC	94
6 ZUSAMMENFASSUNG	98
7 TEILPUBLIKATIONEN	100
LITERATURVERZEICHNIS	101

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A 23187	Calcium-Ionophore
Ac-DEVD-CHO	Ac-Asp-Glu-Val-Asp-al (spezifischer Caspase-3-Inhibitor)
AEC	Amino-9-Ethylcarbazol
Ang II	Angiotensin II
APAAP	Alkalische Phosphatase-antialkalinische Phosphatase-Markierung
Apaf-1	Apoptotische Proteasen aktivierender Faktor 1
BH-Domäne	Bcl-2-Homologie-Domäne
BH4	Tetrahydrobiopterin
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin
CAD	Caspase-3 abhängige DNaseI
CaM	Calmodulin
cGMP	zyklisches Guanylatmonophosphat
CHX	Zykloheximid
Ci	Curie
cpm	counts per minute
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DAB	Diaminobenzidin
DFF	DNA-fragmentierender Faktor
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiotreitol
E 64	N-[N-(L-3-Trans-carboxyrane-2-carbonyl)-L-Leucyl]-Agmatin
ECL	enhanced chemiluminescens
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzym
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
eNOS-/-	eNOS-Knockout
FAD	Flavinadenindinukleotid
FFH-Kaninchen	Froxford heritable hyperlipidemic-Kaninchen mit genetisch induzierter Hyperlipidämie
FMN	Flavinmononukleotid
HDL	high density lipoprotein
H-Kaninchen	Cholesterin-gefütterte Kaninchen
HUVEC	Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (<i>human umbilical vein endothelial cells</i>)
Hrk	Harakiri (Genprodukt)
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
iNOS-/-	iNOS-Knockout
kD	Kilodalton
LDL	low density lipoprotein
LN ^G MMA	L-N ^G -Monomethyl-L-arginin
MΦ	Makrophagen
MM	Magermilchpulver
MW	Mittelwert

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: p53 moduliert die Zellantwort auf DNA-Schäden	9
Abb. 2: Modulation der Apoptose durch Caspasen, Bcl-2 ähnliche Proteine und p53	9
Abb. 3: Grundstruktur der verschiedenen Isoformen der NO-Synthasen	11
Abb. 4: Ischämie/Reperfusion-Versuchsschema in der Langendorff-Apparatur	16
Abb. 5: Aufteilung der Langendorff-Herzen in Segmente für die verschiedenen Analysen	16
Abb. 6: Ablaufschema des <i>Ribonuclease-Protection Assays</i> (RPA)	27
Abb. 7: In situ-Detektion apoptotischer Zellen (TUNEL) in Kaninchen-Aorten	35
Abb. 8: Nachweis der DNA-Fragmentierung in genetischer Hyperlipidämie durch radioaktive Markierung	36
Abb. 9: Identifizierung TUNEL-positiver Zelltypen in Aorten aus genetisch-modifizierten Kaninchen	37
Abb. 10: Bax-, Bcl-2 und p53-Protein in der Hyperlipidämie	39
Abb. 11: Lokalisation Bax-immunreaktiver Zellen in Kaninchenaorten aus H-Tieren	40
Abb. 12: Lokalisation Bax-immunreaktiver Zellen in Kaninchenaorten aus FFH-Tieren	41
Abb. 13: Serum-Lipide, Zusammensetzung des Gesamtcholesterins	43
Abb. 14: In situ-Detektion apoptotischer Zellen (TUNEL) in akut abgestoßenen Herz-Allotransplantaten	44
Abb. 15: Nachweis der DNA-Fragmentierung in der akuten Abstoßung allogener Herztransplantate (d10) durch radioaktive Markierung	45
Abb. 16: Erhöhte Bax-Expression in der akuten Abstoßung allogener Herztransplantate	46
Abb. 17: Zeitabhängige Degradation von Bcl-2 in der akuten Abstoßung allogener Herztransplantate	47
Abb. 18: Die Bcl-2 Proteolyse in der akuten Abstoßung findet nicht auf transkriptioneller Ebene statt (RNase-Protection-Assay)	48
Abb. 19: Abbau von [³⁵ S]-markierten Bcl-2 in der akuten Abstoßung	49
Abb. 20: Einfluß von Proteaseinhibitoren auf die Bcl-2 Proteolyse in der akuten Abstoßung	51
Abb. 21: Einfluß von Cysteinprotease-Inhibitoren auf die Bcl-2 Proteolyse in der akuten Abstoßung	52

Abb. 22: Partielle Hemmung der Proteolyse von [³⁵ S]-Bcl-2 durch Inhibitor von Perforin	53
Abb. 23: Einfluß redoxabhängiger Prozesse auf die Bcl-2 Proteolyse in der akuten Abstoßung	54
Abb. 24: Dosisabhängige Effekte von NO auf die Bcl-2 Proteolyse in der akuten Abstoßung	55
Abb. 25: In situ-Detektion apoptotischer Zellen (TUNEL) in Rattenherzen	57
Abb. 26: Nachweis der DNA-Fragmentierung in Ischämie und Reperfusion durch radioaktive Markierung	58
Abb. 27: Bax und Bcl-2 Protein werden in Ischämie und Reperfusion nicht reguliert	60
Abb. 28: Nachweis der proteolytischen Spaltung der Caspase-3 in Ischämie und Reperfusion im Western Blot	61
Abb. 29: Nachweis der endogenen Caspase-Spaltungsaktivität in Ischämie und Reperfusion	62
Abb. 30: Nachweis der DNA-Fragmentierung in der Hypoxie in Ratten	64
Abb. 31: Regulation von Bax, Bcl-2 und p53 Protein in hypoxischen Rattenherzen	65
Abb. 32: Nachweis der DNA-Fragmentierung in der Hypoxie in Mäusen	66
Abb. 33: Regulation von Bax und Bcl-2 Protein in Mäuseherzen	67
Abb. 34: Nachweis der DNA-Fragmentierung in NOS-Knockout-Mäusen durch radioaktive Markierung	68
Abb. 35: Regulation von Bax und Bcl-2 Protein in NOS-Knockout-Mäusen in Normoxie und Hypoxie	69
Abb. 36: Regulation von eNOS Protein in NOS-Knockout-Mäusen in Normoxie und Hypoxie	70
Abb. 37: Hemmung der durch TNF/CHX induzierten eNOS-Degradation in HUVEC durch Inhibitoren des Proteasomenkomplexes	73
Abb. 38: eNOS-Degradation in Kontrollextrakten	74
Abb. 39: Hemmung der durch TNF/CHX induzierten eNOS-Degradation in HUVEC durch Inhibitoren des Proteasomenkomplexes	75
Abb. 40: Versuchsschema zur Ermittlung der cGMP-Akkumulation zur indirekten Messung der NO-Synthaseaktivität	76
Abb. 41: Effekte von TNF/CHX auf die eNOS-Aktivität	77

Abb. 42: Zeitabhängiger Einfluß von TNF/CHX auf HSP90 in HUVEC	78
Abb. 43: Zeitabhängiger Einfluß von TNF/CHX auf HSP70 in HUVEC	79
Abb. 44: Zeitabhängiger Einfluß von TNF/CHX und Shear Streß auf Caveolin-1 in HUVEC	80
Abb. 45: Abhängigkeit der Apoptose vom Plaquestadium	82
Abb. 46: Bedeutung der Apoptose in der Atheroskleroseentwicklung	84
Abb. 47: Bcl-2-Proteolyse in akut abgestoßenen Herz-Allotransplantaten	86

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Einteilung der atherosklerotischen Läsionen (nach Stary, 1995)	2
Tabelle 2: Einteilung der humanen Caspasen-Protease-Familie in Subfamilien	6
Tabelle 3: Einteilung der Bcl-2-Familie in Säugetieren	7
Tabelle 4: Einteilung der NO-Synthasen	10
Tabelle 5: Übersicht über verwendete Antikörper im Western Blot	25
Tabelle 6: Serum-Lipide	42
Tabelle 7: Übersicht der eingesetzten Protease-Inhibitoren und Konzentrationen	50
Tabelle 8: Apoptose in fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques (Typ V/VI-Läsionen)	81
Tabelle 9: Zusammenfassung der Apoptose in den untersuchten Tiermodelle kardialer Erkrankungen	93

1 EINLEITUNG

Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie die Atherosklerose oder Herzinsuffizienz stellen mit ca. 50% der Todesfälle die häufigste Todesursache dar. Der Aufklärung der zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen kommt deshalb eine große Bedeutung zur Entwicklung präventiver und therapeutischer Maßnahmen zu.

In den letzten Jahren wird zunehmend eine Beteiligung der Apoptose in Herzerkrankungen diskutiert. Das Auftreten von Apoptose konnte z.B. in atherosklerotischen Plaques, beim Myokardinfarkt und bei Herzversagen als Folge der Herztransplantation [52, 61, 75, 133] gezeigt werden. Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Apoptose in

- der durch Hyperlipidämie induzierten Atherosklerose,
- der akuten Abstoßung von Herztransplantaten,
- bei Ischämie und Reperfusion sowie
- bei chronischer Sauerstoffunterversorgung in der Hypoxie untersucht werden.

Atherosklerose

Die Atherosklerose ist die häufigste Ursache für einen Herzinfarkt. Die Pathogenese der Atherosklerose stellt einen mehrere Jahrzehnte andauernden Prozeß dar, der schon im Kindesalter beginnt. Die Pathogenese der Atherosklerose teilt man in unterschiedliche Stadien der Plaqueentwicklung nach dem "Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis" der Amerikanischen Herz Gesellschaft ein ([164], siehe Tab.1). Diese reicht von der intimalen Verdickung im Kindesalter bis hin zu komplizierten Läsionen, die das Gefäß einengen, ab dem 4. Lebensjahrzehnt.

Tabelle 1: Einteilung der atherosklerotischen Läsionen (nach Stary, 1995 [164]): VSMC = vaskuläre glatte Muskelzellen, MΦ = Makrophagen

Läsionentyp	Bezeichnung	Kennzeichen
Typ I	Intimale Verdickung	Adaptive intimale Verdickung durch Proliferation glatter Muskelzellen auf mechanische Einflüsse
Typ II	Fettstreifen	Einlagerung von Schaumzellen (MΦ und VSMC) in die verdickte Intima
Typ III	Prä-Atherom	Kleine Areale extrazellulärer Lipide
Type IV	Atherom	Lipidakkumulation zu einer großen Kernregion
• Typ Va • Typ Vb • Typ Vc	Fibro-Atherom	Fibröse Plaquerdickung mit Lipidakkumulation Kalzifizierte Atherome fibröse Atherome ohne Lipid- und Kalziumakkumulation
Typ VI	Komplizierte Läsion	Thrombus- und Hämatombildung nach Plaqueruptur

Die Bildung atherosklerotischer Läsionen wird durch die Verletzung oder die Dysfunktion des Endothels ausgelöst. Durch die Aktivierung oder Schädigung von Endothelzellen kommt es u.a. zur Thrombozytenadhäsion und -aggregation. Die Sezernierung von Wachstumsfaktoren, wie PDGF (Platelet derived growth factor), hat die Proliferation intimaler glatter Muskelzellen zur Folge, woraus die Gefäßwandverdickung durch Bildung einer Neointima resultiert. Andererseits verursachen Endothelläsionen eine Permeabilitätssteigerung der Gefäßwand, die neben einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen zur Einwanderung von Makrophagen und Leukozyten und nachfolgend zu einer inflammatorischen Reaktion führen kann.

Die Hypercholesterinämie gilt neben dem Rauchen, der Hypertonie und dem Diabetes mellitus als wichtiger Risikofaktor für die Atheroskleroseentstehung [128, 176]. Besonders dem *Low Density Lipoprotein* (LDL) wird atherogene Wirkung zugeschrieben. Physiologisch kann LDL durch reaktive Sauerstoffspezies oder Enzyme, die aus dem umgebenden Gewebe freigesetzt werden, zu oxLDL oxidiert werden. Infiltrierende Makrophagen, welche durch Internalisierung von oxLDL über die Scavenger-Rezeptoren

[23] und der daraus resultierenden intrazellulären Lipidansammlung zu Schaumzellen werden, sezernieren pro-inflammatorische, -thrombotische und -atherogene Substanzen. Durch die Freisetzung von Zytokinen kommt es zur Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen. Die zunächst kleinen Areale extrazellulärer Lipide akkumulieren mit zunehmender Progression der Atherosklerose zu einem Lipidkern. Kalziumeinlagerungen können dann zum fortgeschrittenen Plaque führen, der das Gefäß massiv einengt (Review, siehe Referenz [148]). In Folge einer Plaqueruptur kann es dann zu einer Thrombusbildung und nachfolgend zum Gefäßverschluß kommen, aus dem wiederum Ischämie des umliegenden Gewebes resultiert, was im Infarkt endet.

Verschiedene Untersuchungen der letzten Jahre konnten an humanen Atheroektomien das Vorhandensein von Apoptose in atherosklerotischen Plaques zeigen [52, 61, 67, 108]. Zudem zeigten glatte Muskelzellen (VSMCs) aus Plaques in der Zellkultur eine höhere Rate von Spontanapoptose im Vergleich zu VSMCs aus normalen Gefäßen auf [12]. Die Bedeutung der Apoptose in der Pathogenese der Atherosklerose ist jedoch noch unklar.

Herztransplantation

Die Herztransplantation stellt eine etablierte, lebensverlängernde Therapie von Herz-erkrankungen im Endstadium dar. Dabei bestehen die bedeutendsten Komplikationen in der akuten Transplantatabstoßung und der chronischen Transplantatdysfunktion als Resultat der Transplantatatherosklerose. Die Aufklärung zugrundeliegender Mechanismen könnte zu einem verlängerten Transplantatüberleben und einer verbesserten Prognose für den Patienten beitragen.

Neben den bekannten Komplikationen der Herztransplantation weisen neuere Befunde auf die Beteiligung der Apoptose an diesen Mechanismen hin. So konnte Apoptose bei Herzversagen als Folge von Transplantation gezeigt werden [133]. Ebenso wurde in der akuten Abstoßung von Herztransplantaten Kardiomyozyten-Apoptose beschrieben [79, 167, 168]. Bei der akuten Abstoßung handelt es sich zumeist um die durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) vermittelte Apoptose, die hauptsächlich über das Fas/Fas-Ligand- und das Granzyme B/Perforin-System vermittelt werden. Sowohl in der humanen Herztransplantation [32] als auch in verschiedenen Tiermodellen [79, 125] konnte zudem eine

Erhöhung des Fas-Liganden sowie von Granzyme B und Perforin bei gleichzeitiger Detektion von DNA-Fragmentierung in Zielzellen der akuten Abstoßung allogener Herztransplantate nachgewiesen werden, während CTLs Granzyme B-defizienter Mäuse keine Apoptose in Zielzellen induzieren konnten [161].

Ischämie und Reperfusion / Hypoxie

Eine Folge des atherosklerotischen Gefäßverschlusses oder der Transplantation stellt die Ischämie dar, die durch verminderte Sauerstoff- (Hypoxie) und Nährstoffzufuhr zu Arrhythmien, Kontraktilitätsverlust, Störungen des Membranpotentials und zu Gewebsuntergang durch Nekrose und daraus resultierendem Organfunktionsverlust führen kann. Durch die Hypoxie kommt es zur Umstellung auf anaeroben Metabolismus. Dies induziert eine zelluläre ATP-Depletion, die durch verminderte Aktivität von ATPasen und erhöhten oxidativen Streß in der intrazellulären Ca^{2+} -Akkumulation resultiert. Vermehrte Lactat-Produktion führt zu einer Azidose, wodurch zusätzlich zur Ca^{2+} -Akkumulation pH-abhängige Enzyme (wie z.B. Endonukleasen, die DNA-Fragmentierung bewirken) aktiviert werden können. Dabei kommt es zu Apoptose und Nekrose. Die Wiederherstellung der Organversorgung durch reperfundierende Maßnahmen stellt eine wichtige Therapie dar. Allerdings wirft die das Organ rettende Reperfusion die Probleme der sogenannten Reperfusionsschäden auf, wobei es u.a. aufgrund der Reoxygenierung zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen und der gesteigerten Adhäsion von neutrophilen Granulozyten durch eine inflammatorische Reaktion zu massiven Schädigungen des Organes kommen kann (Review, siehe Referenzen [98, 162]).

Nachdem man beim Myokardinfarkt zunächst von Zelltod durch Nekrose ausging, der aus einem Zusammenbruch des zellulären Energiemetabolismus und Plasmamembranruptur resultierte, konnte in den letzten Jahren, vor allem in der Reperfusion, auch eine Beteiligung der Apoptose gezeigt werden [9, 75, 154]. In vitro konnte durch Hypoxie Apoptose von Kardiomyozyten induziert werden [147, 171]. Verschiedene Studien zeigen, daß Apoptose in durch Ischämie induzierten Reperfusionsschäden in vivo vorkommt [56, 80]. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch noch weitgehend unklar.

1.1 Signaltransduktion der Apoptose

Es werden zwei Formen des Zelltodes unterschieden: Nekrose und Apoptose. Der nekrotische Zelltod ist durch Schädigungen ganzer Gewebsregionen gekennzeichnet und weist die typischen Merkmale der Zellschwellung, gefolgt von Autolyse der Zelle mit Membranruptur und daraus resultierender Enzymfreisetzung auf [25].

Im Gegensatz zur Nekrose erfolgt die Apoptose durch gerichtete Aktivierung von Signaltransduktionswegen, die zum programmierten Tod einer einzelnen Zelle mit charakteristischer DNA-Fragmentierung in Mono- und Oligonukleosomen, Chromatin-Kondensation, Ruptur der Nukleusmembran, Schrumpfen der Zelle und Membranausstülpungen führt [82, 160]. Diese werden durch Phagozytose von den Nachbarzellen eliminiert, ohne eine inflammatorische Antwort auszulösen [34]. Die Signale für die Phagozytose werden dabei hauptsächlich über den Phosphatidylserinrezeptor [14, 44], CD14 [34] und den Vitronectinrezeptor [60, 155] vermittelt. Physiologisch ist die Apoptose von Bedeutung bei der Embryogenese und Organentwicklung, der Kontrolle der Zellzahl sowie bei der Elimination einzelner abnormaler, geschädigter Zellen und nicht mehr benötigter Strukturen. Ineffektive oder fehlende Elimination von malignen oder autoreaktiver Zellen durch Apoptose dagegen kann zur Entwicklung von Autoimmunität (AIDS) und Tumoren führen [172].

Für die Apoptoseinduktion werden verschiedene Signaltransduktionswege beschrieben, die durch hochkonservierte Genprodukte der Nematode *Chaenorhabditis elegans* (*c. elegans*), nämlich die „*Cell death genes*“ (CED) CED-3, CED-4 und CED-9, reguliert werden [41]. In Säugetieren wird die Apoptose hauptsächlich durch die Caspasen, Homologe zu CED-3, Apaf-1 („*apoptotic protease-activating factor*“, homolog zu CED-4) und die Bcl-2 Familie (homolog zu CED-9) reguliert (Review, siehe Referenzen [2, 7]).

Caspasen

Bis heute wurden 11 für Säugetiere relevante Caspasen identifiziert (Tab.2). Die vereinheitlichende Nomenklatur „Caspasen“ wurde 1996 von Alnemri et al. [3]

vorgeschlagen, wobei „C“ für Cysteinprotease steht und „aspase“ für die den Caspasen charakteristische Eigenschaft, Substrate hinter einem Asparagin zu schneiden.

Tabelle 2: Einteilung der humanen Caspasen-Protease-Familie in Subfamilien

Subfamilie	Familienmitglieder	Andere Bezeichnungen
Caspase-1	Caspase-1	ICE
	Caspase-4	ICE _{rel} -III, TX, ICH-2
	Caspase-5	ICE _{rel} -III, Ty
	Caspase-13	ERICE
Caspase-2	Caspase-2	ICH-1
	Caspase-9	Mch-6, ICE-LAP6
Caspase-3	Caspase-3	CPP32, Yama, Apopain
	Caspase-6	Mch-2
	Caspase-7	Mch-3, ICE-Lap3, CMH-1
	Caspase-8	MACH, FLICE, Mch-5
	Caspase-10	Mch-4

Die Caspasen werden in einer proteolytischen Kaskade aktiviert, wobei das inaktive Proenzym unter Abspaltung der Prodomäne in eine größere und eine kleinere Untereinheit gespalten wird, welche durch Heterodimerisierung das katalytisch aktive Enzym bilden [126]. Durch Aktivierung der Caspase-8 wird die Caspase-Kaskade gestartet [7]. An deren Ende steht die proteolytische Aktivierung der Caspase-3, deren Spaltung in p17 und p12 eine Rolle als finaler Apoptose-Exekutor spielt. Über Spaltung von *DNA fragmentierenden Faktor* (DFF, [103]) und Aktivierung der *Caspase-3-abhängigen DNase I* (CAD, [42]) wird die Fragmentierung der chromosomalen DNA initiiert. Inhibierende proteolytische Spaltung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) verhindert gleich-zeitig DNA-Reparaturmechanismen [102].

Bcl-2 ähnliche Proteine

Die heterogene Bcl-2 Familie setzt sich aus verschiedenen pro- und antiapoptotischen Proteinen zusammen [94, 144]. Die Proteinsequenz der Bcl-2-Familie weist vier konservierte Bcl-2-Homologie-Domänen (BH-Domänen) und eine Transmembran-Domäne (TM, siehe Tab. 3), die für die Membranverankerung verantwortlich ist, auf [141].

Tabelle 3: Einteilung der Bcl-2-Familie in Säugetieren: Einteilung der pro- und antiapoptotischen Familienmitglieder nach Subfamilien. *BH1* bis *BH4* sind hochkonservierte Bcl-2-Homologie-Domänen, *TM* ist die für die Membranverankerung verantwortliche Transmembrandomäne (nach Adams 1998, [2]).

Wirkung	Subfamilie	Mitglieder	Konservierte Domänen
Anti-apoptotisch	Bcl-2 Familie	Bcl-2	BH1, BH2, BH3, BH4, TM
		Bcl-x _L	BH1, BH2, BH3, BH4, TM
		Bcl-w	BH1, BH2, BH3, BH4, TM
		Mcl-1	BH1, BH2, BH3, TM
		A1	BH1, BH2,
Pro-apoptotisch	Bax-Familie	Bax	BH1, BH2, BH3, TM
		Bak	BH1, BH2, BH3, TM
		Bok	BH1, BH2, BH3, TM
	BH3-Familie	Bik	BH3, TM
		Blk	BH3, TM
		Hrk	BH3, TM
		BNIP3	BH3, TM
		Bim _L	BH3, TM
		Bad	BH3, TM
		Bid	BH3

Den proapoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedern fehlt die BH4-Domäne, was auf ihre Bedeutung für die antiapoptotische Wirkung schließen läßt. Für die proapoptotische Funktion scheint die BH-3-Domäne von besonderer Bedeutung zu sein, da die Proteine der neuen, stetig wachsenden proapoptotischen BH3-Familie (wie z. B. Bik [62] und Hrk [72]) nur noch die BH3-Domäne aufweisen. Die Domänen BH1-BH3 scheinen die Dimerisierung zu beeinflussen. Die genaue Bedeutung der einzelnen BH-Domänen ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt.

Die einzelnen Bcl-2 Familienmitglieder können Homo- und Heterodimere bilden, wodurch die Apoptoseinduktion moduliert werden kann. Das Verhältnis von antiapoptotischen Bcl-2 zu proapoptotischen Bax scheint kritisch für das Zellüberleben zu sein. Wie die Bcl-2-Familienmitglieder Apoptose modulieren, ist noch nicht vollständig geklärt.

Für das antiapoptotische Bcl-2 wurden folgende Funktionen identifiziert:

- antioxidativen Wirkung [71],
- Hemmung proapoptotischer Bcl-2-Mitglieder durch Heterodimerisierung [92, 179],
- Aufrechterhaltung des Membranpotentials [157],
- Hemmung der Freisetzung mitochondrialer proapoptotischer Proteine (wie Cytochrom C [1, 86, 180],

- Inaktivierung des proapoptotischen Apaf-1/Caspase-9-Komplexes [181].

Die proapoptotische Wirkung von Bax wird neben der Heterodimerisierung mit antiapoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedern durch die Bindung an den *permeability transition pore complex* erklärt, wodurch die Membranpermeabilität steigt [114], das Membranpotential reduziert wird [134] und mitochondriale Proteine, wie Cytochrom C [134, 151], freigesetzt werden.

p53

Neben den Caspasen und der Bcl-2 Familie stellt p53 ein wichtiges Apoptose-modulierendes Protein dar. p53 ist das am häufigsten mutierte Protein in Tumoren. Als „Wächter des Genoms“ moduliert p53 als transkriptioneller Regulator die Zellantwort auf DNA-Schädigungen – Reparatur geschädigter Gene oder Induktion von Apoptose (Abb. 1). DNA-Schädigungen induzieren über p53 den Zellzyklus-Arrest, um Reparaturprozesse zu initiieren [99, 135] oder Apoptose auszulösen. p53 bewirkt den Stillstand des Zellzyklus am G1 Checkpoint (durch Induktion von p21-Genexpression) oder am G2 Checkpoint (durch Induktion von 14-3-3 σ , [70]). Dadurch wird der Übergang in die DNA-Synthesephase (S-Phase) bzw. der Übergang der abgeschlossenen S-Phase in die Mitose gehemmt. Gleichzeitig induziert p53 GADD45, welches DNA-Reparaturmechanismen bewirkt. Über Aktivierung der Caspasen und Bax [120, 122] sowie über Repression von Bcl-2 [120, 121] induziert p53 Apoptose. Die Beteiligung von p53 in der Apoptose kardio(-vaskulärer) Erkrankungen wird kontrovers diskutiert.

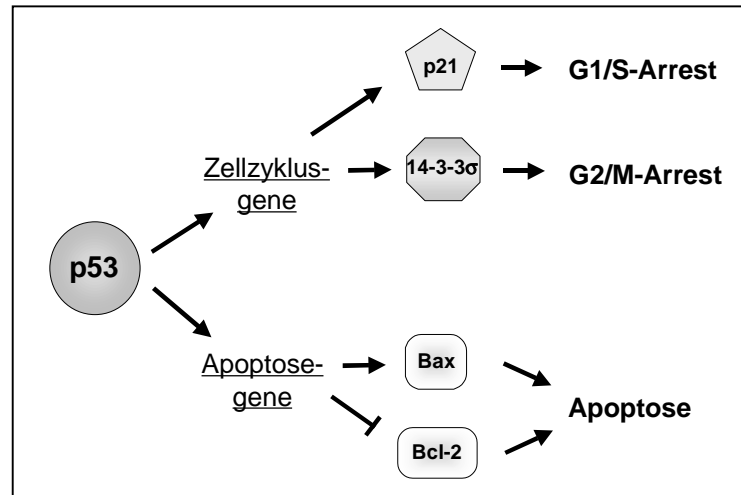


Abb. 1: p53 moduliert die Zellantwort auf DNA-Schäden. Über Induktion von Zellzyklusgenen wird der Zellzyklus angehalten, um geschädigte DNA zu reparieren. Sind die Schäden zu groß, induziert p53 Apoptose über Modulation wichtiger Genen, wie Bcl-2 und Bax.

Modulation der Apoptose durch Caspasen, Bcl-2 ähnliche Proteine und p53

Die beschriebenen Proteinfamilien (Caspasen, Bcl-2-Familie und p53) interagieren, wie in Abbildung 2 dargestellt, miteinander, um die Apoptose zu modulieren.

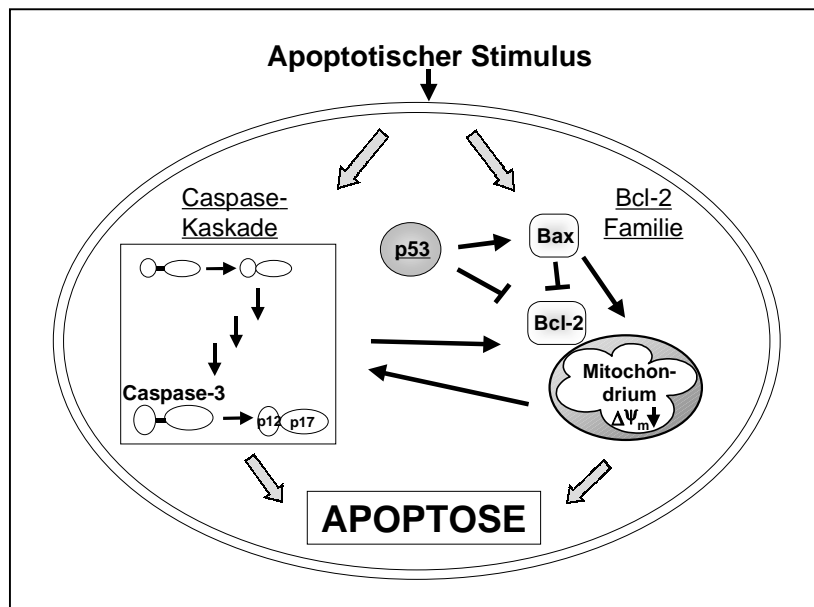


Abb. 2: Modulation der Apoptose durch Caspasen, Bcl-2 ähnliche Proteine und p53.
 $\Delta\Psi_m$ = mitochondriales Transmembranpotential.

1.2 Stickstoffmonoxid, NO-Synthasen und Apoptose

Das kurzlebige Radikal Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiger physiologischer Mediator mit vielfältigen biologischen Funktionen, wie die Vermittlung der Vasodilatation, die Hemmung der Plättchen-Aggregation [123, 127] und die Reduktion der Leukozyten-Adhäsion [123]. Die Produktion großer NO-Mengen durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) dagegen hat zytotoxische Wirkung und spielt eine wichtige Rolle in der unspezifischen Immunabwehr gegen Bakterien ([57], siehe auch Tab. 4).

NO entsteht bei der Umsetzung von L-Arginin in L-Citrullin durch die NO-Synthasen. Die Familie der NO-Synthasen setzt sich aus drei verschiedenen Isoformen zusammen (Tab. 4): die neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS I), die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS II) und die endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOS III). Die Familie der NOS-Synthasen wird in die Subfamilien der konstitutiven NOS und der induzierbaren NOS unterteilt. Die Calcium/Calmodulin-abhängige schnelle Aktivierung der konstitutiven NOS resultiert in der Produktion kleiner NO-Mengen, welche z.B. Vasodilatation und Plättchenaggregation modulieren. Dagegen ist für die durch Zytokine induzierte Aktivierung der induzierbaren NOS die mehrere Stunden benötigende Proteinneusynthese notwendig, woraus aber die Produktion großer Mengen NO zur Immunabwehr resultiert [21, 48, 139].

Tabelle 4: Einteilung der NO-Synthasen. EC = Endothelzellen, VSMC = vaskuläre glatte Muskelzellen, MΦ = Makrophagen, Ca = Calcium, CaM = Calmodulin.

Subfamilie	Isoformen	Vorkommen	Funktion	Aktivierung	NO-Menge
Konstitutive NOS	Neuronale NOS (nNOS)	Neuronen, Epithel-, Mesangial-, Skelettmuskelzellen	Neurotransmitter	schnell, keine Neusynthese notwendig, Ca/CaM-abhängig	pmol
	Endotheliale NOS (eNOS)	EC, VCMC	<ul style="list-style-type: none"> • Vasodilatation, • hemmt Plättchenaggregation/-adhäsion • hemmt VSMC-Proliferation 		
Induzierbare NOS	Induzierbare NOS (iNOS)	VSMC, MΦ, EC	Immunabwehr	Ca/CaM-unabh., langsam, da Neusynthese notwendig	nmol

Allen Isoformen der NO-Synthasen ist die Grundstruktur gemeinsam (Abb. 3): die Oxygenase-Domäne, bestehend aus Häm-/L-Arginin und Tetrahydrobiopterin-Domänen, und die Reduktase-Domäne, bestehend aus FMN-, FAD- und NADPH-Domänen, werden durch die Kalzium/Kalmodulin-Bindungsdomäne verbunden.

Das Dimer des Enzymes bildet zusammen mit den Coenzymen Tetrahydrobiopterin (BH₄), Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), Flavinmononukleotid (FMN) und Flavin-adenin-dinukleotid (FAD) sowie mit Häm den katalytisch aktiven Komplex. Die für die NO-Synthasen einzigartige Myristoylierungssite der eNOS unterscheidet sie von den anderen NO-Synthasen. Durch die posttranslationale Acylierung liegt die eNOS hauptsächlich an Membranen gebunden vor.

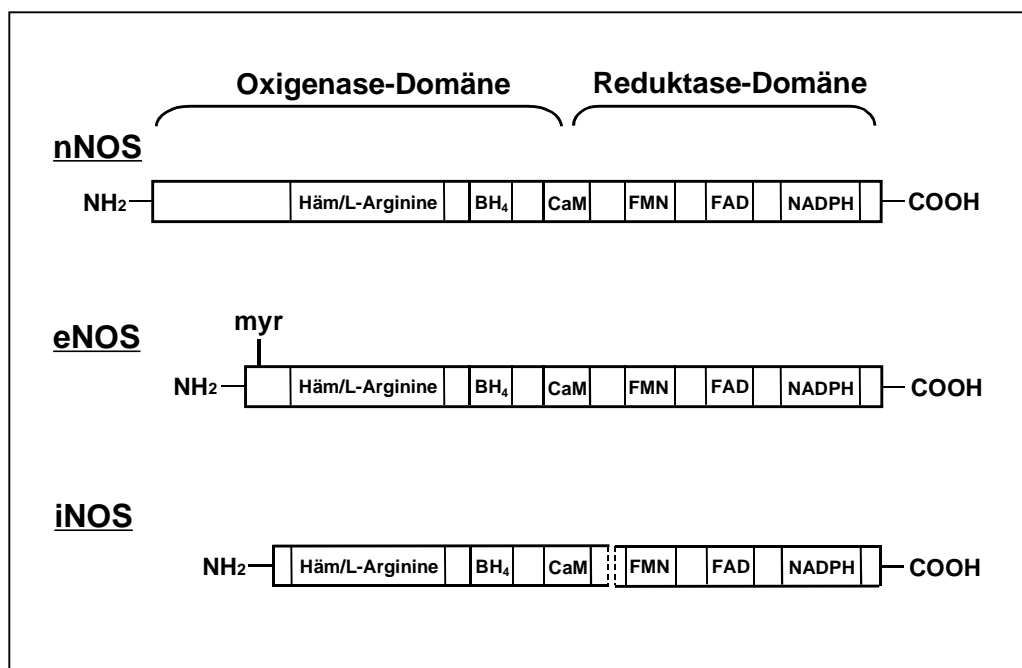


Abb. 3: Grundstruktur der verschiedenen Isoformen der NO-Synthasen. Die Bidomänenstruktur ist allen Isoformen gemeinsam. Die iNOS unterscheidet sich von der konstitutiv exprimierten nNOS und eNOS durch die Ca/CaM-Unabhängigkeit. Die eNOS besitzt im Gegensatz zu den anderen Isoformen eine Myristoylierungssite (= myr), welche für die Membranverankerung verantwortlich ist.

Obwohl die eNOS konstitutiv exprimiert ist, konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, daß sie nicht nur auf Proteinebene, sondern auch transkriptionell reguliert werden kann [146]. Erhöhte Schubspannung des Blutes induziert die eNOS-Expression [129]. Ebenso

beeinflusst die Zelldichte die eNOS-Expression: konfluente, ruhende Endothelzellen exprimieren geringere Mengen eNOS-mRNA im Vergleich zu proliferierenden, subkonfluenten Endothelzellen [6]. OxLDL [101], TNF- α [185] und Hypoxie [97, 107] dagegen vermindern die Menge der eNOS-Transkripte.

Die Rolle von NO auf die Apoptose-Signaltransduktion wird kontrovers diskutiert. Initial wurde gezeigt, daß NO Apoptose in verschiedenen Zelltypen induziert [49, 53, 130, 137, 187]. Im Gegensatz dazu zeigen neuere Studien anti-apoptotische Effekte von NO [35, 36, 111]. Diese gegensätzlichen Befunde lassen sich durch dosisabhängige Effekte von NO auf die Apoptose erklären, da gezeigt werden konnte, daß niedrige Konzentrationen an NO protektive Effekte auf die durch TNF- α induzierte Apoptose in HUVEC hatten, während hohe Dosen zytotoxisch und proapoptotisch wirkten [59]. In Kardiomyozyten konnte gezeigt werden, daß Transfektion mit endothelialer NO-Synthase (eNOS) die Apoptose reguliert [81]. Die Induktion der iNOS in Myokard-Infarkt scheint für Kardiomyozyten-Apoptose verantwortlich zu sein [165]. Im Gegensatz dazu demonstrieren andere Studien protektive Effekte von NO auf Kardiomyozyten-Apoptose. Es wurde gezeigt, daß NO-Donoren gegen Streßinduzierte Apoptose schützen. Gabe bzw. Infusion von L-Arginin, dem Substrat der NO-Synthase oder NO-Donoren verlängerten zudem das Kardiomyozyten-Überleben [55, 132].

2 PROBLEMSTELLUNG

Die Bedeutung der Apoptose und die zugrundeliegenden Mechanismen in verschiedenen pathophysiologischen Zuständen des Herzens sind noch weitgehend ungeklärt und es bleibt zu zeigen, daß die Apoptose-Signaltransduktion ähnlich reguliert wird, wie aus in vitro-Versuchen bekannt ist. Deshalb sollte die Apoptose in verschiedenen Tiermodellen kardialer Erkrankungen untersucht werden, um Hinweise auf die zugrundeliegende Signaltransduktion, durch Analyse der Bcl-2 Familienmitglieder Bcl-2 und Bax, der finalen Exekutor-Caspase Caspase-3 oder p53 zu bekommen:

1. Charakterisierung der **Apoptose in der Atherosklerose**: Beteiligung der Apoptose in der genetischen und durch Diät induzierten Hyperlipidämie in Kaninchen unter Verwendung von „Froxfield Heritable Hypercholesterolemic“-Kaninchen sowie Wildtyp-Kaninchen, die mit einer Cholesterin-Diät gefüttert wurden.
2. Untersuchung der **Apoptose in der akuten Abstoßung** von allogenen Herztransplantaten in Ratten am heterotopen Modell Wistar Furth zu Lewis.
3. Untersuchung der **Apoptose in Ischämie und Reperfusion** *ex vivo* in Langendorff-Rattenherzen sowie Untersuchung der **Apoptose in der chronischen Hypoxie** *in vivo* an Ratten.
4. Neben den bekannten physiologischen Funktionen von NO konnte auch eine Beteiligung an der Modulation der Apoptose gezeigt werden. Die Bedeutung von NO wird dabei noch kontrovers diskutiert. Da Zellkulturversuche **protektive Effekte von NO** auf Apoptose, die z.B. durch TNF- α und AngII induziert wurde [36, 35], zeigten, sollte deren physiologische Relevanz überprüft werden:

- Bedeutung der endogenen NO-Synthese auf die Ischämie/Reperfusion-induzierte Apoptose durch Supplementierung der Perfusionslösung mit dem kompetitiven NO-Synthase-Inhibitor L-N^G-Monomethyl-L-Arginin (LN^{MMA}).
- Charakterisierung der Bedeutung des endogen freigesetzten NO auf die Apoptose-induktion in Herzen von NO-Synthase-Knockout-Mäusen.

Da proatherosklerotische und proinflammatorische Faktoren die NO-Freisetzung hemmen können, sollte die Regulation der **Proteinexpression der eNOS** durch TNF- α in der Endothelzellkultur (HUVEC) untersucht werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tiermodelle

3.1.1 Haltung der Tiere

Die Haltung der Tiere erfolgte nach ethischen Richtlinien in einem abgeschlossenen Tierstall mit standardisierten Bedingungen (künstlichen Licht mit Hell-/Dunkelphasen (12:12 Stunden) und 25°C Raumtemperatur) in Standardkäfigen (1 Kaninchen, 3 Ratten bzw. 5 Mäuse pro Käfig) bei freiem Zugang zu Futter und Wasser (*Ausnahme*: Kaninchen, da hier die Futteraufnahme kontrolliert wurde, um eine gleiche Futteraufnahme zu erreichen). Die Kaninchen und Ratten wurden von Harlan bezogen, die C57BL/6-Mäuse von Jackson Laboratories, die NO-Synthase-Knockoutmäuse von Dr. Ed Shesely und Dr. Oliver Smithies, Departement of Cardiothoracic Surgery, University of Virginia. Die Hyperlipidämie-, Transplantations- und Hypoxiemodelle wurden durch die Ethikkommission genehmigt.

3.1.2 Genetische- und Fütterungsinduzierte Hyperlipidämie in Kaninchen

Zur Untersuchung der Bedeutung von Apoptose in atherosklerotischen Plaques wurden folgende Gruppen von Kaninchen (2-3 kg) untersucht:

1. Kontrolltiere: „New Zealand White Rabbits“ mit normaler Diät (Standardfutter von Albonun) für 12 Wochen (n=5)
2. Fütterungsinduzierte Hyperlipidämie (=H): New Zealand White Rabbits mit Cholesterin-Diät für 12 Wochen (n=8, 0,25% Cholesterin, 3% Kokosnuß-Öl)
3. Genetisch-induzierte Hyperlipidämie (=FFH): „Froxfield Heritable Hypercholesterolemic Rabbits“ mit normaler Diät für 12 Wochen (n=8).

Bei den genetisch veränderten Kaninchen handelt es sich um eine Kreuzung aus „Watanabe Heritable Hypercholesterolemic Rabbits“ (WHH, fibröse Plaques ohne Kalzifizierungen und Schaumzelleneinlagerung) mit „Half loop Rabbits“ (LDL-Rezeptor-Defizienz). Diese Kreuzung hat den Vorteil, daß sie im Vergleich zu WHH-Kaninchen weniger letal sind und fibröse Plaques entwickeln, die denen in Patienten ähnlich sind.

Nach Ablauf der 12 Wochen wurde den Kaninchen Blut entnommen, um Serumlipide (siehe Punkt 3.5) zu bestimmen. Danach wurden die Tiere sakrifiziert und die Aorten explantiert.

Für DNA- und Proteinanalysen wurden die Explantate in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bei -80°C gelagert und, wie unter Punkt 3.3.1.1 bzw. 3.6.1.1 beschrieben, aufgearbeitet. Für die immunhistochemischen Analysen wurden die Aorten in 4% PBS-gepufferten Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet.

3.1.3 Akute Abstoßung in der allogenen Herztransplantation an Ratten

Es wurde das Wistar-Furth zu Lewis heterotope Herztransplantationsmodell verwendet [158]. Dies beinhaltet einen MHC Klasse I und II Mismatch und ist dadurch vollständig allogene. Die heterotope Transplantation der Herzen männlicher gewichtsdefinierter Wistar-Furth Ratten (300-350g) erfolgte in mikrochirurgischer Standardtechnik an die großen Abdominalgefäße. Hierbei wurde die Aorta des Spenderherzens mit der Aorta abdominalis des Empfängertieres und die Aorta pulmonalis mit der Vena cava inferior anastomosiert. Das Transplantatüberleben wurde durch digitale Palpation überprüft, Abstoßung als nicht mehr tastbare Myokardkontraktion definiert und durch eine Laparotomie verifiziert [156]. Diese Herztransplantate werden in akuter Weise von 6 - 10 Tagen (6.9 ± 2.1 , $n=15$) abgestoßen. Deshalb wurden am Tag 7 abgestoßene explantierte Herzen ($n=8$) zur DNA- und Proteinanalyse, wie unter Punkt 3.3.1.1 bzw. 3.6.1.1 beschrieben, aufgearbeitet. Als Kontrolle wurden Herzen unbehandelter Lewisratten verwendet.

3.1.4 Ischämie und Reperfusion in Rattenherzen (Langendorff-Apparatur)

Die isolierten Herzen ($1,8 \pm 0,2$ g, $n=6$ pro Gruppe) gewichtsdefinierter Wistarratten (469 ± 37 g Körpergewicht) wurden über die Aorta bei 37°C in einer Langendorff-Apparatur mit oxygenierter Krebs-Henseleit-Lösung (120 mM NaCl, 4,63 mM KCl, 1,17 mM KH_2PO_4 , 1,25 mM CaCl_2 , 1,2 mM MgCl_2 , 20 mM NaHCO_3 und 8 mM Glucose, pH 7,4) perfundiert. Nach 30-minütiger Äquilibration (siehe Abb. 4) wurde durch Stoppen der Perfusion für 30 Minuten globale Ischämie simuliert, welche von einer 30-minütigen Reperfusion (mit normaler Perfusion der Nährlösung) gefolgt wurde. Um die Bedeutung der endogenen Stickstoffmonoxid-Synthese zu untersuchen, wurde der Nährlösung in Ischämie und Reperfusion der kompetitive Inhibitor der endogenen NO-Synthase L- N^{G} -Monomethyl-L-arginin (1 mM, Alexis, Grünberg) zugesetzt.

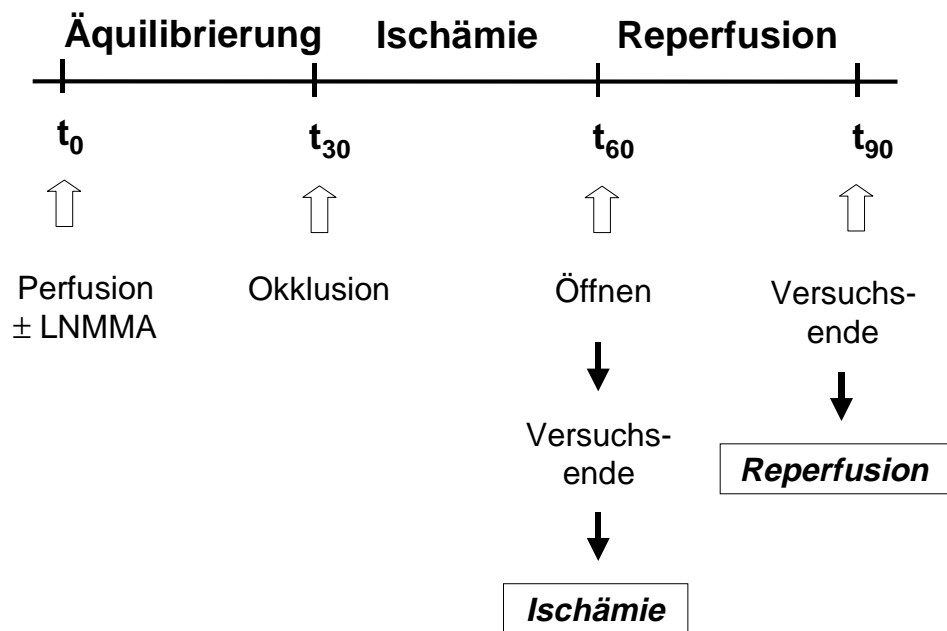


Abb. 4: Ischämie/Reperfusion-Versuchsschema in der Langendorff-Apparatur: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaues (siehe Text).

Nach Beendigung der Experimente wurden die Herzen in drei Teile geteilt (Abb. 5). Die äußeren Segmente wurden für DNA- und Proteinanalysen, die mittleren Segmente für die Immunhistochemie (Präparation siehe Punkt 3.3.1.1 und 3.6.1.1) verwendet.

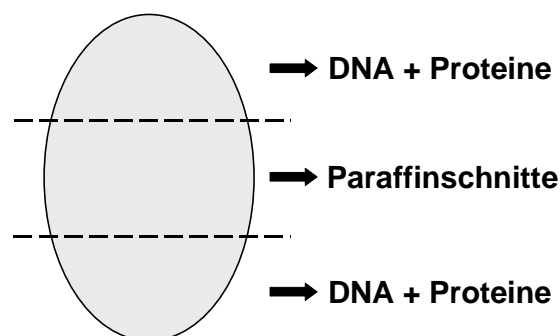


Abb. 5: Aufteilung der Langendorff-Herzen in Segmente für die verschiedenen Analysen. Die äußeren Segmente wurden für DNA- und Proteinanalysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren, die mittleren Segmente wurden für Paraffinschnitte in PBS-gepuffertem 4%-Formalin fixiert.

3.1.5 Hypoxie im Ganztiermodell an Ratten und Knockout-Mäusen

Gewichtsdefinierte, männliche Wistar-Ratten (300-350g, n=4 pro Gruppe) wurden für 21 Tage in Kammern mit kontrollierter Atmosphäre gehalten. Normoxie: normale Raumluft (~21% Luftsauerstoff), Hypoxie: 10% Luftsauerstoff.

Im Mausmodell wurden drei verschiedene Gruppen von gewichtsdefinierten männlichen Mäusen (n=2 pro Gruppe) für 21 Tage in den gleichen Bedingungen für Normoxie und Hypoxie gehalten:

1. Kontrolltiere: Wildtyp-Mäuse C57BL6
2. eNOS-Knockout-Mäuse, mit fehlendem Gen für endotheliale NO-Synthase (eNOS^{-/-})
3. iNOS-Knockout-Mäuse, mit fehlendem Gen für induzierbare NO-Synthase (iNOS^{-/-})

Nach Versuchsende wurden die Herzen explantiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für DNA- und Proteinanalysen bei -80°C gelagert.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Humane Venöse Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC)

Primäre HUVEC (Cell Systems, Bonn) werden in Endothelzell-Medium (Cell Systems, Bonn) mit 10% fötalen Kälberserum (GIBCO, Hamburg), 10 ng/ml epidermale Wachstumsfaktoren, 1 µg/ml Hydrocortison, 12 µg/ml Rinderhirn-Extrakt, 50 µg/ml Gentamicin und 50 ng/ml Amphotericin im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C und 5% CO₂ bis zur 3. Passage kultiviert.

Zur Passagierung wird das Nährmedium entfernt, die Zellen einmal mit sterilem Phosphatpuffer (PBS, Gibco, Hamburg) gewaschen und mit Trypsin inkubiert, bis sich die Zellen abrunden. Anschließend werden die Zellen in Medium mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturflaschen (Greiner) gelöst und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Je nach Versuchsansatz werden die Zellen in einer Zellzahl von $0,8 \times 10^5$ /ml bis 4×10^5 /ml in Kulturschalen ausgebracht, für weitere 18 Stunden kultiviert und je nach Versuchsansatz inkubiert.

3.2.2 Jurkat-Zellen

Jurkat-Zellen sind Suspensions-Kulturen und werden in RPMI-Medium (Gibco, Hamburg) mit 10% fötalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin (100 U, 0,1 mg/ml) bei

37°C und 5% CO₂ inkubiert. Alle 3 Tage wird die Zellzahl auf 0,5x10⁵/ml eingestellt. Für Apoptose-Versuche werden 1x10⁶ Zellen /ml verwendet.

3.3 Apoptose-Nachweise

Die DNA-Fragmentierung in Mono- und Oligo-Nucleosome von 180-200 bp stellt ein charakteristisches Merkmal der Apoptose dar und kann zum Apoptosenachweis verwendet werden. Im Folgenden werden die verschiedenen verwendeten Methoden der Detektion von DNA-Fragmenten beschrieben.

3.3.1 Nachweis der DNA-Fragmentierung in Gesamt-DNA (*DNA-Leiter*)

3.3.1.1 DNA-Isolation aus Tierorganen

Teile des Organes werden isoliert, in einem Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff pulverisiert, in 1 ml Lysispuffer (5 mM Tris, pH 8,0, 20 mM EDTA, 0,5% Triton und 50 µg/ml RNaseA) aufgenommen und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, um RNA aus der Präparation zu entfernen. Anschließend wird das Lysat mit 0,5 mg/ml Proteinase K und 20% SDS versetzt und für 16 Stunden bei 65°C unter Schwenken inkubiert.

Die DNA wird durch Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert. Dazu wird das mit Proteinase K verdaute Homogenat mit 500 µl Phenol/Chloroform (1:1, TE, pH 8,0-gesättigt) geschüttelt und für 5 Minuten mit 20000 x g zentrifugiert. Die obere Phase wird zu 500 µl Chloroform gegeben, geschüttelt und erneut zentrifugiert. Aus der oberen Phase wird die DNA mit 70% Isopropanol und 0,1 M NaCl gefällt und durch 20-minütige Zentrifugation bei 20000 x g pelletiert. Das entstehende DNA-Pellet wird in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8 und 1 mM EDTA) aufgenommen und die DNA-Konzentration spektrophotometrisch bei 260 nm UV-Licht im Fotometer (Beckmann) ermittelt (OD_{260nm}=1 entspricht 50 µg DNA/ml).

3.3.1.2 Radioaktive Markierung der DNA-Fragmente (Rösl, 1994)

DNA-Fragmente werden durch eine modifizierte Klenow-Reaktion mit [α -³²P]-dCTP markiert [152]. 2-5µg DNA werden in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 5 mM MgCl₂ mit 5 U

Klenow-Polymerase (Boehringer, Mannheim) und 0,5 μCi [α - ^{32}P]-dCTP (Amersham, Braunschweig) in einem Reaktionsansatz von 30 μl Gesamtvolumen für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 mM EDTA gestoppt. Anschließend werden nicht eingebaute Nukleotide über eine Sephadex G 50-Säule abgetrennt. Zur Herstellung der G 50-Säule wird eine 1 ml Spritze mit 7% Sephadex (Pharmacia, gelöst in H_2O) gefüllt und durch Zentrifugation verdichtet. Danach wird die Säule zweimal mit TE gespült und anschließend mit 30 μl destilliertem Wasser äquilibriert. Die markierte DNA wird im Southern Blot auf eine Membran transferiert. Dazu wird die radioaktiv markierte DNA zunächst in einem 1,8% TBE-Agarosegel aufgetrennt (2,5h bei 90 V). Zur Kontrolle der Gleichladung der einzelnen Proben wird die mit Ethidiumbromid gefärbte DNA im Agarosegel auf einem UV-Tisch fotografiert. Danach wird das Gel in 0,25 M HCl geschüttelt, bis sich die Bromphenolblau-Bande gelb färbt. Nun wird durch Schütteln in 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH denaturiert und in 1 M Tris/HCl, pH 7,4, 1,5 M NaCl neutralisiert. Die DNA wird aus dem Gel auf eine Hybond- N^+ Membran (Amersham, Braunschweig) transferiert, in Frischhaltefolie verpackt und auf einen Autoradiographie-Film (Amersham, Braunschweig) exponiert. Die Signale auf dem Film zeigen die qualitative DNA-Fragmentierung auf.

3.3.2 Immunhistochemischer *In situ*-Apoptosenachweis: Terminale-Deoxynucleotidyl-Transferase-mediertes dUTP Nick-End Labeling (*TUNEL-Färbung*)

Apoptose kann im Gewebe über Markierung der DNA-Strangbrüche mit terminaler Deoxynucleotidyltransferase nachgewiesen werden (nach Gavrieli, 1992 [51] geringfügig modifiziert nach Kockx, 1996 [87]). In Paraffin eingebettete Organstücke werden in 4% PBS-gepuffertem Formalin fixiert. 5 μM -Paraffinschnitte werden zunächst mit Xylol und einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 95%, 90%, 70% und 50%) entparaffiniert. Anschließend werden die Schnitte mit 3% Natriumcitrat (1 h) gefolgt von 15-minütiger Inkubation mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K (Sigma, München) permeabilisiert. Nach Hemmung der endogenen Peroxidase-Aktivität werden freie 3'-OH-Gruppen mit biotynilierten-dUTP (1:200, Boehringer, Mannheim) in Gegenwart von 0,3 e.u./ μl Terminaler Deoxynucleotidyltransferase (TdT, Sigma/München) in TdT-Puffer (30 mM Tris, 140 mM Natrium-Cacodylate, 1 mM Kobalt-Chlorid, pH=7,2) durch 1-stündige Inkubation bei Raumtemperatur markiert. Anschließend werden markierte Strangbrüche über das Biotin-

Avidin-System (Vectastain ABC, Vector Labs) detektiert und Peroxidase-Aktivität mit 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) unter Erhalt eines roten Farbniederschlags visualisiert. Als Positivkontrolle wird eine unbehandelte Probe mit 25 µg/ml Dnase I für 1 Stunde inkubiert, als Negativkontrolle wird eine unbehandelte Probe ohne terminale Deoxynukleotidyltransferase inkubiert. Es erfolgt eine Gegenfärbung mit Hämatoxinilin.

3.4 Immunhistochemie

3.4.1 Doppelfärbung: TUNEL und Oberflächenmarker für VSMC/Makrophagen

Nach der unter Punkt 3.3.2 beschriebenen TUNEL-Färbung wird für die Doppelfärbung die „Drei-Schritt APAAP-Methode“ verwendet. Nach Inkubation mit den Oberflächenmarker für glatte Muskelzellen (α -Aktin, HHF 35, 1:100, DAKO, Hamburg) oder Makrophagen (RAM 11, 1:500, DAKO, Hamburg) wird die alkalische Phosphatase durch Umsetzung der Substrate Naphtol AS-MX Phosphat und Fast Blue BB Salz (beide Sigma, München) durch einen blauen Farbniederschlag visualisiert. Endogene Alkalische Phosphatase wird durch Zugabe von 0,01 ml 1M Levamisol zu der Substratlösung blockiert. Aus dieser Doppelfärbung resultiert die rote Färbung apoptotischer Nuclei und die blaue Anfärbung des Zytosols von Makrophagen oder VSMCs.

3.4.2 Doppelfärbung: Bax und Oberflächenmarker für VSMC/Makrophagen

Zunächst wird die immunhistochemische Färbung von Bax mit der „Zwei-Schritt Avidin-Biotin Komplex-Methode“ durchgeführt. Nach Permeabilisierung durch Druckkochen in 10 µM Citrat, pH 6 (5 min.) wird mit dem biotinylierte Antikörper gegen Bax (1:50, Santa Cruz, Heidelberg) inkubiert. Die Peroxidase wird mit Diaminobenzidin (DAB) unter Erhalt eines braunen Farbniederschlags umgesetzt. In einem zweiten Färbeschritt werden unter Verwendung der Drei-Schritt APAAP-Methode die Oberflächenmarker α -Aktin oder RAM 11 gefärbt (siehe 3.4.1). Die alkalische Phosphatase wird mit AEC unter Erhalt eines roten Farbniederschlags umgesetzt. Mit Hämatoxinilin erfolgt eine leichte Gegenfärbung der Kerne.

3.5 Bestimmung von Serumlipiden

3.5.1 Bestimmung des Gesamtcholesterins im Serum

Zur Bestimmung des Gesamtcholesterins im Serum wird ein kommerziell erhältlicher Enzymassay (Boehringer, Mannheim) verwendet. Das Testprinzip beruht auf drei aufeinanderfolgenden enzymatischen Reaktionen: Cholesterinester wird durch Cholesterinesterase in Cholesterin umgesetzt, woraus wiederum durch Cholesterinoxidase Δ^4 -Cholestenon unter H_2O_2 -Freisetzung gebildet wird. Das Substrat 4-Aminophenazon reagiert zusammen mit dem entstandenen H_2O_2 durch eine Peroxidase in 4-(p-Benzochinon-monoimino)-phenazon, welches spektrophotometrisch bei 500 nm quantifiziert werden kann.

3.5.2 Bestimmung der Lipoproteine im Serum

Die Lipoproteine werden aus dem Serum durch sequentiellen Ultrazentrifugation (Beckmann) entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt [66]. Dafür wird das Serum zunächst 18h (43000 rpm, 4°C) zentrifugiert. Die entstehende obere Phase stellt die *VLDL-Fraktion* dar und wird abpipettiert. Der verbleibende Rest wird mit Dichtelösung LDL (Dichte = 1,063: 153 g NaCl und 345 g KBr auf 1 l H_2O) versetzt und erneut für 21 h zentrifugiert (43000 rpm, 4°C). Wiederum wird die obere Phase, welche die *LDL-Fraktion* darstellt, abgenommen und der Rest mit Dichtelösung HDL (Dichte = 1,21: 200 g NaCl und 450 g KBr auf 1 l H_2O) versetzt. Nach 21h Zentrifugation (43000 rpm, 4°C) wird die obere *HDL-Fraktion* abpipettiert. Die verschiedenen Lipoproteinfraktionen werden anschließend spektrophotometrisch quantifiziert.

3.5.3 Bestimmung der Triglyceride im Serum

Zur Messung der Triglyceride im Serum wird ein kommerziell erhältlicher enzymatischer Assay (Boehringer, Mannheim) verwendet, wobei die Triglyceride durch eine Lipase in Glycerin und die freien Fettsäuren gespalten werden. Das entstehende Glycerin wird spektrophotometrisch bei 500 nm quantifiziert.

3.6 Methoden zur Analyse von Proteinen

3.6.1. Isolation von Proteinen

3.6.1.1. aus Gewebe

Teile des Organs werden im Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff pulverisiert und in 1 ml Lysispuffer (1% Triton-X100, 0,32 M Sucrose, 5 mM EDTA (pH 8.0), 10 mM Tris (pH 8.0), 1 mM PMSF, 2 mM DTT) für 30 Minuten auf Eis lysiert. Anschließend wird bei 20000 x g für 15 Minuten zentrifugiert und die Proteinkonzentration im Überstand, der das Zellproteinlysate enthält, nach Bradford photometrisch bei 595 nm Wellenlänge bestimmt. Die Eichkurve wird mittels BSA erstellt.

3.6.1.2 aus Zellen

1×10^6 Zellen werden mit einem Zellschaber vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst und bei 800 x g pelletiert. Nach einmaligen Waschen mit PBS werden die Zellen mit Lysispuffer (siehe Punkt 3.6.1.1) für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Das nach Zentrifugation erhaltene Proteinlysate wird vermessen (siehe Punkt 3.6.1.1).

3.6.2 Trichloressigsäure (TCA)-Fällung von Proteinen (nach Bensadoun, 1976, [16])

Zu Proteinhomogenate werden 5% TCA gegeben und für mindestens 30 min. bei -20°C inkubiert. Nach dem Auftauen der Probe auf Eis wird durch Zugabe von 1:0,5 (v/v) 1 M HEPES (pH > 8) neutralisiert und für 15 min. bei 20000 x g zentrifugiert. Das resultierende Pellet wird in 2x SDS-Probenpuffer (s. 3.6.4) aufgenommen.

3.6.3 Immunpräzipitation aus Zell-Lysaten

Das Prinzip der Immunpräzipitation besteht darin, daß Proteine und daran gebundene Interaktionspartner gezielt aus einem Gesamtprotein-Extrakt isoliert werden können.

150 µg Protein (siehe 3.6.1) werden mit Inkubationspuffer (10 mM Tris, pH 7,4, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton-X100, 0,5% Nonidet (NP-40), 2mM PMSF und 2mM ortho-Vanadat) auf eine Endkonzentration von 1 µg/µl eingestellt und für 16 Stunden mit 3 µg Antikörper, der gegen das zu präzipitierende Protein gerichtet ist, unter Schütteln bei 4°C koinkubiert. Anschließend wird der Antikörper-Proteinkomplex über die Ig-Kette an

Agarose-Beads (60 µl A/G-Plus-Agarose, Santa Cruz, Heidelberg) fixiert und ungebundene Proteine werden durch 5 maliges Waschen in Inkubationspuffer entfernt. Das verbleibende Agarose-Bead-Pellet wird in 60 µl 2 x SDS-Probenpuffer (siehe 3.6.4) aufgenommen, 10 Minuten bei 95°C inkubiert und 2 min bei 20000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

3.6.4 Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970)

Durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteingemische nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Auflösung ist dabei vom Vernetzungsgrad des Geles abhängig, der von der Menge an Acryl/Bisacrylamid bestimmt wird [95]. Die Trenngellösung (1,5 mM Tris/HCl, pH 8,8, 0,4% SDS) wird zwischen zwei Glasplatten, die durch 1,5 mm dicke Spacer getrennt werden, gefüllt und mit 0,1% SDS überschichtet. Nach Polymerisation wird das SDS entfernt und die Sammelgellösung über das Trenngel geschichtet (1 M Tris/HCl, pH 6,8, 0,4% SDS). Ein Probenkamm wird in die flüssige Lösung eingesetzt, wodurch nach Polymerisation des Geles Taschen entstehen. Das Gel wird in eine Elektrophoresekammer gesetzt. Die Proteinproben werden mit 2x SDS-Probenpuffer (0,125 M Tris/HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% Glycerin, 0,005% Bromphenolblau und 100 mM DTT) versetzt, für 5 min. bei 95°C inkubiert und in die Geltaschen geladen. Als Laufpuffer dient 0,25 M Tris, 0,96 M Glycin und 1% SDS. Die angelegte Stromstärke beträgt 20 mA im Sammelgel und 30 mA im Trenngel.

3.6.5 Silberfärbung (Morissey, 1981)

Die Silberfärbung stellt eine sensitive Methode zur Visualisierung kleiner Proteinmengen bis zu 100 ng Protein/mm² dar. Zunächst werden die Proteine im Polyacrylamidgel mit 50% Methanol, 12% Essigsäure und 0,019% Formaldehyd fixiert (> 4 Stunden, RT) und dreimal mit 10% Ethanol gewaschen. Zur Reduktion der Proteine wird das Gel 1 min in 0,2 g/l Na₂S₂O₃ x 5 H₂O geschwenkt und anschließend dreimal für 30 Sekunden in H₂O gespült. Nach 6-minütigem Imprägnieren mit 2 g/l AgNO₃ und 0,028% Formaldehyd wird wiederum dreimal für 30 Sekunden mit H₂O gewaschen, um überschüssiges Silbernitrat zu entfernen. Durch Inkubation in Entwicklerlösung (6% Na₂CO₃, 0,028% Formaldehyd, 0,0008% Na₂S₂O₃ x 5 H₂O) werden die Proteine durch Reduktion von Silberionen zu metallischen

Silber gefärbt. Die Färbung wird durch Neutralisation (50% Methanol, 12% Essigsäure) gestoppt [124].

3.6.6 Transfer von Proteinen (Western Blot)

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten, negativ geladenen Protein-SDS-Komplexe werden durch elektrische Spannung auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore, Eschborn) transferiert und durch hydrophobe Wechselwirkungen darauf fixiert.

3.6.6.1 Semidry-Blotting (für Proteine < 50 kD)

Zunächst wird eine PVDF-Membran für 5 Sekunden in 100% Methanol, 2 Minuten in H₂O und anschließend in Semidry-Blottingpuffer (0,048 M Tris, 0,039 M Glycin, 0,037% SDS, 20% Methanol) gewässert. Nun wird ein Sandwichkomplex, bestehend aus 3 Whatman 3MM Papieren, der vorbehandelten PVDF-Membran, dem Gel und wiederum drei Whatmann 3MM Papieren, in einer Semidry Blot-Apparatur (Bio Rad, Heidelberg) aufgebaut. Innerhalb von 30 Minuten werden die Proteine durch die angelegte Stromstärke von 3 mA/cm² auf die PVDF-Membran transferiert.

3.6.6.2 Wet-Blotting (für Proteine > 50 kD)

Die PVDF-Membran wird 5 Sekunden in 100% Methanol, 2 Minuten in H₂O und anschließend in Wet-Blottingpuffer (0,05 M Tris, 0,38 M Glycin, 0,1% SDS, 20% Methanol) gewässert, in einem Sandwichkomplex (siehe 3.6.6.1.) zwischen „Scotch pads“ eingeklemmt und in eine vollständig mit Wet-Blottingpuffer gefüllte Blotkammer (Bio Rad Transoblot, Heidelberg) eingehängt. Der Transfer erfolgt für > 8 Stunden bei 35 Volt.

3.6.7 Immunfärbung von Western Blots

Die Immunfärbung erfolgt in allen Schritten bei Raumtemperatur (RT) auf einem Schüttler (Heidolph). Die PVDF-Membran, auf welche die Proteine transferiert wurden, wird mit 3% Bovinem Serum Albumin (BSA, Fraktion V, Merck, Darmstadt) in TBS (50 mM Tris/HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,1% Tween 20) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu Blockieren (2 h). Nun wird mit einem Primärantikörper (0,1-1 µg/ml) gegen das zu untersuchende Protein inkubiert (siehe Tabelle 5). Nach 1-stündiger Inkubation mit dem an eine Peroxidase gekoppelten IgG Antikörper wird die Peroxidase über

Chemilumineszenzentwicklung (ECL-System, Amersham, Hannover) umgesetzt und einem speziellen ECL-Film (Amersham, Hannover) exponiert. Die resultierenden „Banden“ des Zielproteines können mit einem computergestützten Quantifizierungsprogramm (Scion-image) densitometrisch quantifiziert werden.

Tabelle 5: Übersicht über verwendete Antikörper im Western Blot. Die Antikörper wurden in TBS/ 0,1% Tween und der angegebenen Blockierungssubstanz inkubiert. Die Inkubationszeit betrug, wenn nicht anders angegeben, 2 h RT für die Primär- und 1 h RT für die Sekundärantikörper. Maus- und Kaninchen-2.AK von Amersham, Braunschweig, Ziege-2.AK von Santa Cruz, Heidelberg. Hersteller und eingesetzte Konzentrationen. MM= Magermilchpulver (MILUPA, Friedrichsdorf).

Antikörper (AK)	Verdünnung	2. Antikörper	Verdünnung und Blocklösung
Bcl-2 (Santa Cruz, Heidelberg)	1:500	Kaninchen	1:4000 in 5% MM
Bax (Santa Cruz, Heidelberg)	1:500	Kaninchen	1:4000 in 5% MM
p53 (Calbiochem, Bad Soden)	1:300	Maus	1:4000 in 5% MM
CPP32p17 (Santa Cruz, Heidelberg)	1:75 in 1h RT	Ziege	1:6000 in 1% FCS/BSA, 45' RT
eNOS (Transduction Laboratories, Hamburg)	1:10 000	Maus	1:4000 in 3% BSA
iNOS (Transduction Laboratories, Hamburg)	1:5000	Maus	1:4000 in 3% BSA
HSP 70 (Upstate Biotechnologies, Hamburg)	1:1000	Kaninchen	1:4000 in 3% BSA
HSP90 (Transduction Laboratories, Hamburg)	1:1500	Maus	1:4000 in 3% BSA
Caveolin (Transduction Laboratories)	1:10 000	Maus	1:4000 in 3% BSA

3.7 RNA-Isolation aus Gewebe und *Ribonuclease Protection Assay*

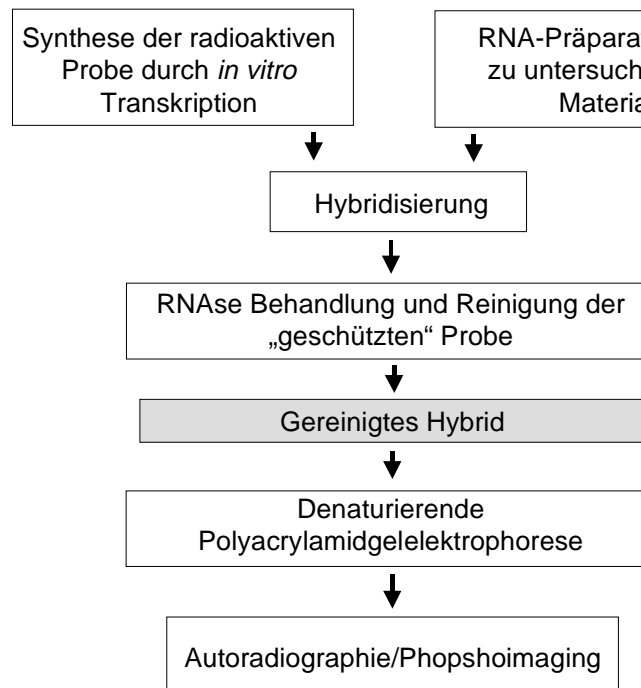
3.7.1 RNA-Isolation aus Gewebe

20-30 mg des Organes werden im Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff pulverisiert und RNA wird unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Kits (RNeasy-Mini-Kit, Qiagen, Hilden) isoliert. Zunächst wird das pulverisierte Gewebe je nach eingesetzter Gewebemenge in 350-600 µl Lysispuffer homogenisiert. Durch Zugabe von 1 Volumen Ethanol zu diesem Lysat werden Konditionen geschaffen, die eine selektive Bindung von RNA an die Membran der Zentrifugations-Säulen erlauben. Dieses Probengemisch wird auf die Säule gegeben und durch Zentrifugation bei $\geq 8000 \times g$ für 15 Sekunden wird die Gesamt-RNA an die Membran gebunden. Durch 3 maliges Waschen mit jeweils 500 µl Waschpuffer werden Kontaminationen entfernt. Anschließend wird die aufgereinigte RNA durch Zugabe von 30-50 µl RNase-freien Wasser und 1-minütiger Zentrifugation bei $\geq 8000 \times g$ eluiert. Die RNA-Konzentration wird spektrophotometrisch bei 260 nm UV-Licht im Fotometer (Beckmann) ermittelt ($OD_{260nm}=1$ entspricht 40 µg RNA/ml).

Für die Verwendung der RNA im RNase-Protection-Assay wird die RNA gefällt. Hierfür wird die RNA-Probe mit ½ Volumen RNase-freiem H₂O, ½ Volumen 100 % Isopropanol und 62,5 mM NaCl versetzt und für 45 Minuten bei 20000 $\times g$ zentrifugiert. Das entstehende Pellet wird mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen und in 8 µl Hybridisierungspuffer des Ribonuclease Protection Assay Kits (Pharmingen, San Diego) aufgenommen.

3.7.2 RNase-Protection-Assay (RPA)

Der Ribonuclease-Protection-Assay (Pharmingen) stellt eine hochempfindliche und spezifische Methode zur Detektion und Quantifizierung von mRNA-Spezies dar, wobei die Expression verschiedener mRNA-Spezies auf einmal untersucht werden können. Das Prinzip des RPA ist in Abb. 6 schematisch dargestellt.

Abb. 6: Ablaufschema des RPA

Zunächst werden 50 ng des Template-Sets mAPO-2 (Pharmingen), welches die murinen Bcl-2-Familienmitglieder Bcl-w, Bfl1, Bcl-x, Bak, Bax, Bcl-2 und Bad sowie die Haushälter-Gene L32 und GAPDH enthält, durch 1-stündige *in vitro*-Transkription bei 37°C in der Gegenwart von 0,1 mCi [α -³²P]-UTP und 20 U T7-RNA-Polymerase radioaktiv markiert. Die entstandene radioaktiv markierte RNA wird durch Phenol-Chloroform-Extraktion gefällt, in Hybridisierungspuffer aufgenommen und der Gehalt an eingebauter Radioaktivität im Scintillationscounter bestimmt. Anschließend wird sie mit Hybridisierungspuffer auf $2,4 \times 10^5$ cpm/ μ l eingestellt.

Nun folgt die Hybridisierung des Überschusses an Template (2 μ l) mit 8 μ l (= 20 μ g) der Ziel-RNA-Lösung durch Linearisierung bei 90°C und folgender Inkubation bei 56°C für 12-16 Stunden sowie 15-minütiger Inkubation bei 37°C. Danach wird die ungebundene Probe und andere Einzelstrang-RNA durch einen Verdau mit RNase (480 ng RNaseA + 1500 U RNaseT1) aus dem Reaktionsansatz entfernt. Die verbleibenden Hybride werden durch Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt und im denaturierenden 5% Poly-Acrylamid-Gel (74,5 ml Acrylamidlösung: 19:1 Acrylamid/Bis-Acrylamid, 0,5 x TBE, 35,82 g Harn-

stoff, 0,06% Ammonium-Persulfat und 0,08% TEMED) bei 50 Watt in 1,5 Stunden aufgetrennt. Als Laufpuffer dient 0,5xTBE (5,4 g Tris, 2,75 g Borsäure, 1 mM EDTA auf 1 l H₂O). Das getrocknete Gel wird einer Fotoplatte exponiert und die entstandenen Banden werden im Phosphoimager (Beckmann) quantifiziert.

3.8 Plasmidpräparation aus Bakterien

3.8.1 Herstellung CaCl₂-kompetenter Bakterien

Ein Klon der kompetent zu machenden Bakterien (E. coli-Stamm: TG-1) wird in 2 ml LB-Medium (10 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl auf 1 l H₂O, pH 7,2) über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Diese Vorkultur wird nun in 100 ml LB-Medium überführt und bis zu einer OD_{600nm}=0,5 weiterinkubiert. Durch Zentrifugation bei 800 x g für 10 min. (4°C) werden die Bakterien pelletiert, in 30 ml Puffer 1 (30 mM Kaliumacetat, 50 mM Manganchlorid, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 0,2 mM EDTA und 5% Glycerin) aufgenommen und 10 min. bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (7 min., 800 x g, 4°C) wird das erhaltene Pellet in 4 ml Puffer 2 (10 mM MOPS, pH 7, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl und 15% Glycerin) resuspendiert, in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.8.2 Transformation von TG-1

100 µl CaCl₂-kompetenter TG-1 (s. 3.8.1) werden mit 0,01-0,1 ng Plasmid-DNA versetzt und für 30 min. auf Eis inkubiert. Durch den folgenden Hitzeschock (2 min. 42°C) gelangt die Plasmid-DNA in die Bakterien. Anschließend wird für weitere 2 min. auf Eis inkubiert. Dann wird die Suspension auf TB-Agarplatten (12 g Bactotrypton, 24 g Bacto Hefeextrakt, 8 ml 50% Glycerol, 100 ml Kaliumphosphatpuffer (0,17 M KH₂PO₄, 0,72 M K₂HPO₄), 1,5% Bactoagar) ausplattiert und über Kopf bei 37°C inkubiert.

3.8.3 Bakterienkultur zur Vermehrung der Plasmid-DNA und Plasmid-DNA-Präparation

Eine transformierte Bakterienkolonie (siehe 3.8.2) wird in 100 ml TB-Medium (12 g Bactotrypton, 24 g Bacto Hefeextrakt, 8 ml 50% Glycerol, 100 ml Kaliumphosphatpuffer (0,17 M KH_2PO_4 , 0,72 M K_2HPO_4 auf 1 l H_2O +50 μl Ampicillin) suspendiert und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Nach Zentrifugation bei 3500 rpm (10 min.) werden die pelletierten Bakterien in 4 ml Lösung 1 (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert, mit 10 ml Lösung 2 (0,2 M NaOH, 1% SDS in H_2O) versetzt und 5-10 min. bei RT inkubiert. Anschließend werden 7,5 ml Lösung 3 (3 M Kaliumacetat, 5 M Essigsäure) dazugegeben, geschüttelt, 5 min. bei RT inkubiert und für 10 min. bei 3500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird zunächst mit 10 ml Phenol-Chloroform pH>8,0 versetzt und für 10 min. bei 3500 rpm zentrifugiert. Zu der resultierenden oberen Phase werden 5 ml Chloroform gegeben und erneut bei 3500 rpm zentrifugiert. Nach Zugabe von 13 ml Isopropanol wird für 10 min. bei RT inkubiert und dann für 15 min. bei 3500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wird in 700 μl TE (10 mM Tris/HCl, pH 8, 1 mM EDTA) und 7 μl RNase (DNase-frei, Boehringer, Mannheim) durch Inkubation bei 37°C (30 min.) gelöst, mit 700 μl 13% PEG/1,6 M NaCl für 5 min. auf Eis gefällt und 15 min. bei 20000 x g zentrifugiert. Das in TE gelöste Pellet wird erneut Phenol-Chloroform extrahiert (1-2 mal 500 μl Phenolchloroform, 1 x 500 μl Chloroform). Durch Zugabe von 600 μl Isopropanol und 50 μl Na-Acetat (pH 7,5) zu der oberen Phase der Chloroform-Extraktion wird die Plasmid-DNA gefällt. Nach dem Pelletieren (20 min., 20000 x g) und Waschen in 70% Ethanol wird das gereinigte DNA-Pellet in 300-500 μl TE aufgenommen und vermessen (siehe 3.3.1.1).

3.9 In vitro-Transkription und Translation von Proteinen

Zur radioaktiven Markierung von Proteinen durch In vitro-Transkription und -Translation wird ein kommerziell erhältlicher Kit (TNT[®] coupled Reticulocyte Lysate System, Promega) verwendet. 1-2 μg Plasmid-DNA (Zielsequenz in pcDNA 3.1 (Quiagen, Hilden) mit T7-Promotor) werden in Gegenwart von Reticulozyten-Lysat, 1 μl T7-RNA Polymerase, 1 mM Aminosäuremix ohne Methionin, 40 nCi [³⁵S]-Methionin und 40 U RNasin[®] (Ribonuclease Inhibitor) in einem Gesamtvolumen von 25 μl für 90 min. bei 30°C inkubiert. Nach

Inkubationsende wird der Reaktionsansatz für 45 min. auf Eis gestellt und anschließend in den *in vitro*-Degradationsassay eingesetzt.

3.10 In vitro-Degradationsassay radioaktiv markierter Proteine

3.10.1 In vitro-Degradation von [³⁵S]-Bcl-2

Zur Untersuchung der Proteolyse von Bcl-2 in der akuten Abstoßung von allogenen Herztransplantaten in Ratten wurde ein *in vitro*-Degradationsassay aufgebaut.

Hierzu werden 0,5 µl [³⁵S]-markiertes Bcl-2 (siehe 3.9) mit 100 µg Proteinhomogenat in Inkubationspuffer (50 mM HEPES, pH 7,5, 10% Sucrose, 100 mM NaCl, 0,1% CHAPS) für 24 h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle dient ein Reaktionsansatz, der bei 4°C inkubiert wird. Um unspezifische Proteolyse von Bcl-2 auszuschließen, wird [³⁵S]-Bcl-2 sowohl ohne zusätzliche Proteinhomogenate in Inkubationspuffer bei 4°C und 37°C (= Lysat) als auch mit 100 µg Proteinhomogenaten aus unbehandelten Herzen (= Kontrolle) inkubiert. Nach Versuchsende werden die Reaktionsansätze mit TCA gefällt (siehe Punkt 3.6.2.), in 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und in einem 14%-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Trocknen in einem Vakuum-Geltrockner (Biorad) wird das Gel einem Autoradiographie-Film (Amersham, Braunschweig) exponiert.

3.10.2 In vitro-Proteolyse von [³⁵S]-Caspase-3

Dieser Degradationsassay wurde aufgebaut, um die endogene Caspase-Spaltungsaktivität in Proteinhomogenaten der Herzen in Ischämie und Reperfusion nachzuweisen. Als Referenzsystem zur Etablierung des Assays wurden Proteinhomogenate aus anti-Fas behandelte Jurkatzellen verwendet, da die Fas-induzierte Apoptose über die proteolytischen Aktivierung der Caspase-Kaskade mediiert wird.

Aus 1×10^6 Jurkatzellen/ml, welche für 3 Stunden mit 2 µg/ml anti-Fas (Immunotech) bei 37°C inkubiert werden, werden Proteine isoliert (siehe Punkt 3.6.1.2). 0,5 µl [³⁵S]-Caspase-3 (siehe 3.9) werden mit 100 µg Proteinhomogenat (aus Jurkatzellen oder Rattenherzen (siehe 3.1.3)) in Inkubationspuffer (50 mM HEPES, pH 7,5, 10% Sucrose, 100 mM NaCl, 0,1% CHAPS, 10 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 µg/ml Aprotinin und 1 µg/ml Leupeptin) für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Weiteres Vorgehen: siehe Punkt 3.10.1.

3.10.3 In vitro-Degradation von eNOS (nicht radioaktiv)

1×10^6 HUVEC werden für 2 ½ Stunden (50 ng/ml TNF- α) bzw. 2 h (50 ng/ml TNF- α + 20 μ g/ml CHX) bei 37°C inkubiert. 60 μ g Proteinhomogenat (siehe 3.6.1.2) aus diesen vorstimulierten Zellen werden in Gegenwart von 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 und verschiedenen Inhibitoren (siehe Ergebnisse) für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wird ein Reaktionsansatz bei 4°C inkubiert. Um unspezifische eNOS-Proteolyse auszuschließen, werden zusätzlich Proteinhomogenate aus unbehandelten Zellen bei 4°C und 37°C untersucht. Nach Zugabe von 2 x SDS-Probenpuffer werden die Proteine im 8%-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Western Blot immungefärbt.

3.11 Indirekte Bestimmung der eNOS-Enzymaktivität (Messung der cGMP-Akkumulation)

3.11.1 Behandlung und Aufarbeitung der Zellen (HUVEC)

1×10^6 HUVEC werden je nach Reaktionsansatz für die angegebene Zeit inkubiert. Um die Aktivität der eNOS zu ermitteln, wird die indirekte Bestimmungsmethode der Ermittlung der cGMP-Akkumulation verwendet, da Stickstoffmonoxid über Aktivierung der Guanylatzyklase die cGMP-Bildung induziert. Zunächst werden HUVEC mit den Stimuli TNF- α , CHX und ZLLLH für 7 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wird 1mM IBMX, welches die Akkumulation von cGMP bewirkt, zugegeben und für weitere 30 min. inkubiert. Nach anschließender 10 min. Inkubation mit 1 μ M A23187 (Calcium-Ionophor) wird die TCA-Fällung durchgeführt. Dazu wird das Medium abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen, die Zellen in 500 μ l 6% TCA mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und das Protein nach 15-minütiger Inkubation auf Eis durch Zentrifugation pelletiert. Der Überstand wird durch 3 maliges Schütteln in 500 μ l Ether neutralisiert und in den cGMP Enzymimmunoassay eingesetzt.

3.11.2 cGMP Enzymimmunoassay (EIA)

Zur Ermittlung der cGMP-Akkumulation wird ein kommerziell erhältlicher Enzymimmunoassay (Amerham, Hannover) verwendet. Das Testprinzip basiert auf der kompetitiven Bindung von cGMP aus der zu untersuchenden Probe und einer definierten Menge an Peroxidase-markierten cGMP an eine limitierte Menge eines cGMP-spezifischen Antikörpers, welcher über einen Zweitantikörper an eine Mikrotiterplatte immobilisiert wird. Die Peroxidase des gebundenen markierten cGMPs wird durch Zugabe des Substrates 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) unter Bildung eines grünen Reaktionsproduktes umgesetzt, welches spektrophotometrisch bei 450 nm im ELISA-Reader quantifiziert werden kann. Anhand einer gleichzeitig angefertigten Eichkurve mit cGMP-Standard wird die Menge an cGMP im zu untersuchenden Reaktionsansatz errechnet und als Prozent Kontrolle ($[\text{fmol cGMP}_{\text{Probe}}/\text{fmol cGMP}_{\text{Kontrolle}}] \times 100 = \% \text{ Kontrolle}$) ausgedrückt.

3.12 Statistische Auswertung

Aus den jeweils angegebenen Stichprobenmengen (n) wurden Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) ermittelt. Die statistische Analysen erfolgten unter Verwendung von ANOVA, ergänzt durch einen Bonferroni-Test (SPSS-Software).

4 ERGEBNISSE

4.A UNTERSUCHUNGEN ZUR APOPTOSE IN DER PATHOGENESE KARDIALER UND KARDIOVASKULÄREN ERKRANKUNGEN

Die Signaltransduktion der Apoptose wurde in vitro schon teilweise aufgeklärt. Das Auftreten von Apoptose konnte in verschiedenen Herzerkrankungen, wie z.B. beim Myokardinfarkt, bei Herzversagen als Folge der Herztransplantation und in atherosklerotischen Plaques [75, 133, 52, 61] gezeigt werden, die physiologische Relevanz der Mechanismen, die in vitro gezeigt wurden, bleibt jedoch noch zu zeigen.

4.1 Bedeutung der Apoptose in der Hyperlipidämie

In atherosklerotischen Läsionen wird Zelltod durch Apoptose beschrieben. Die Bedeutung der Apoptose bei der Entstehung atherosklerotischer Läsionen und die zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher noch ungeklärt. Deshalb sollte die Bedeutung der Apoptose in der Atherosklerose im Kaninchenmodell untersucht werden. Dabei wurde die genetisch induzierte Hyperlipidämie in *Froxfeld-Heritable-Hyperlipidemic-Rabbits* (FFH-Tiere, n=8) mit diät-bedingter Hyperlipidämie (12 Wochen Cholesteroldiät) in *New Zealand White Rabbits* (H-Kaninchen, Wildtyp, n=8) verglichen.

4.1.1 Plaque-Entwicklung in genetisch und fütterungsinduzierter Hyperlipidämie

Makroskopische und lichtmikroskopische Untersuchung der Aorten ergaben, daß sich in allen acht untersuchten genetisch modifizierten Kaninchen durchschnittlich $3,9 \pm 1,3$ fortgeschrittenen Plaques mit typischer Morphologie gebildet hatten. Zusätzlich waren in allen Tieren kleine fokale Areale mit Endothel-Denudation vorhanden. Durch Cholesterin-

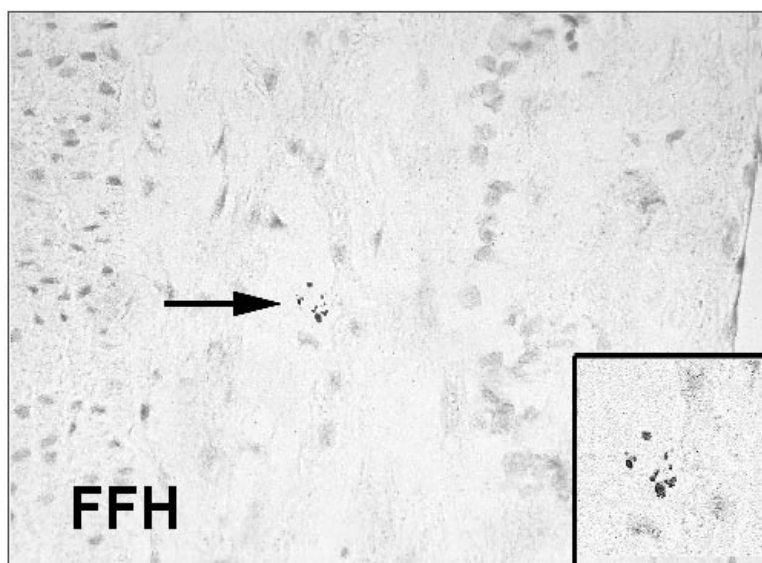
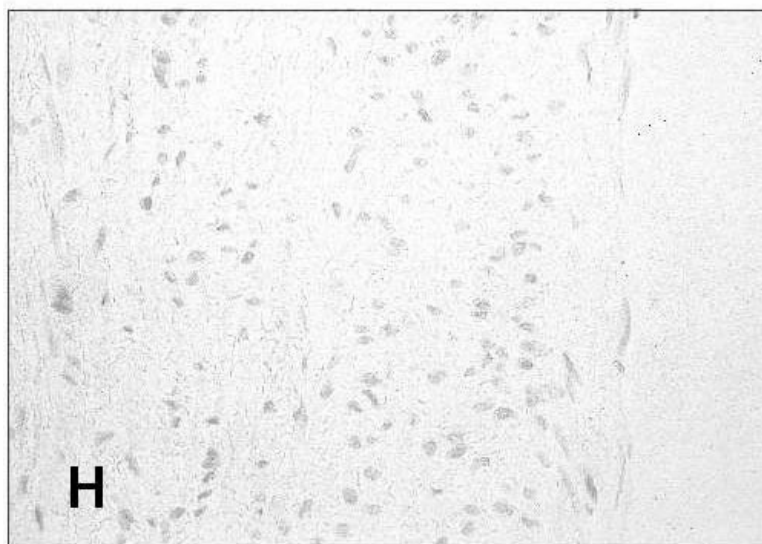
Diät dagegen entwickelte sich nur in einem von 8 untersuchten Tieren ein Plaque im Frühstadium mit intimaler Verdickung, sowie jeweils 1 Fettstreifen in 2 weiteren Tieren, während in den anderen 5 Tieren keine morphologischen Veränderungen zu beobachten waren.

4.1.2 Apoptose in der Hyperlipidämie

DNA-Fragmentierung stellt ein typisches Merkmal der Apoptose dar. Basierend auf der Detektion dieser Strangbrüche wurde sowohl die immunhistochemische „terminale dUTP nick end“-Methode (TUNEL-Färbung, siehe Punkt 3.3.2) durchgeführt, als auch das Auftreten der typischen DNA-Leiter nachgewiesen.

Immunhistochemische Analysen ergaben einen Anteil von $1 \pm 0,5\%$ TUNEL-positive Zellen mit typischer apoptotischer Morphologie in genetisch induzierter Hyperlipidämie (Abb.7), während in durch Fütterung induzierter Hyperlipidämie und in Kontrolltieren keine TUNEL-positiven Zellen zu detektieren waren.

Abb. 7: In situ-Detektion apoptotischer Zellen (TUNEL) in Kaninchen-Aorten. Gezeigt sind typische Ausschnitte von Paraffinschnitten aus Kontrollorten (control), Aorten aus Kaninchen mit 12-wöchiger Cholesterin-Diät (H) und genetisch induzierter Hyperlipidämie (FFH). Die Pfeile weisen auf TUNEL-positive Zellen hin. Da die TUNEL-Färbung auch unspezifische DNA-Fragmente detektiert, wurden TUNEL-positive Zellen unter Berücksichtigung der typischen Morphologie apoptotischer Zellen ausgezählt. →



Diese Ergebnisse wurden durch Analyse der DNA bestätigt (Abb. 8), wobei nur in genetisch induzierter Hyperlipidämie die Fragmentierung der DNA in eine für Apoptose charakteristische DNA-Leiter gezeigt werden konnte.

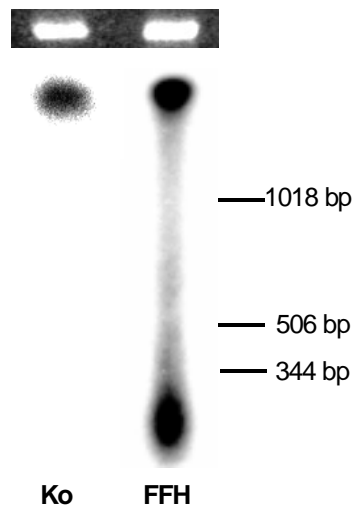


Abb. 8: Nachweis der DNA-Fragmentierung in genetischer Hyperlipidämie durch radioaktive Markierung. Gesamt-DNA aus Kaninchenarterien wurde radioaktiv markiert und in einem Agarosegel aufgetrennt (s. 3.3.1.2). Ethidium-Bromidfärbung zur Verifizierung der Ladungsgleichheit (*oben*) und dazugehöriges Autoradiogramm (*unten*). Ko = Kontrolle, FFH = genetisch induzierte Hyperlipidämie, bp = Basenpaare.

4.1.2.1 Immunhistochemische Identifizierung TUNEL-positiver Zellen in genetisch induzierter Hyperlipidämie

Um TUNEL-positive Zelltypen in durch genetische Hyperlipidämie induzierten Plaques zu identifizieren, wurden zusätzliche Doppelfärbungen mit den Oberflächenmarkern α -Aktin für vaskuläre glatte Muskelzellen und RAM 11 als Marker für Makrophagen durchgeführt. Wie in Abbildung 9 dargestellt, konnte der größte Teil der TUNEL-positiven Zellen mit RAM 11 gefärbt werden. Ebenso konnten apoptotische α -Aktin-positive glatte Muskelzellen sowie vereinzelte Endothelzellen gezeigt werden (Abb. 9).

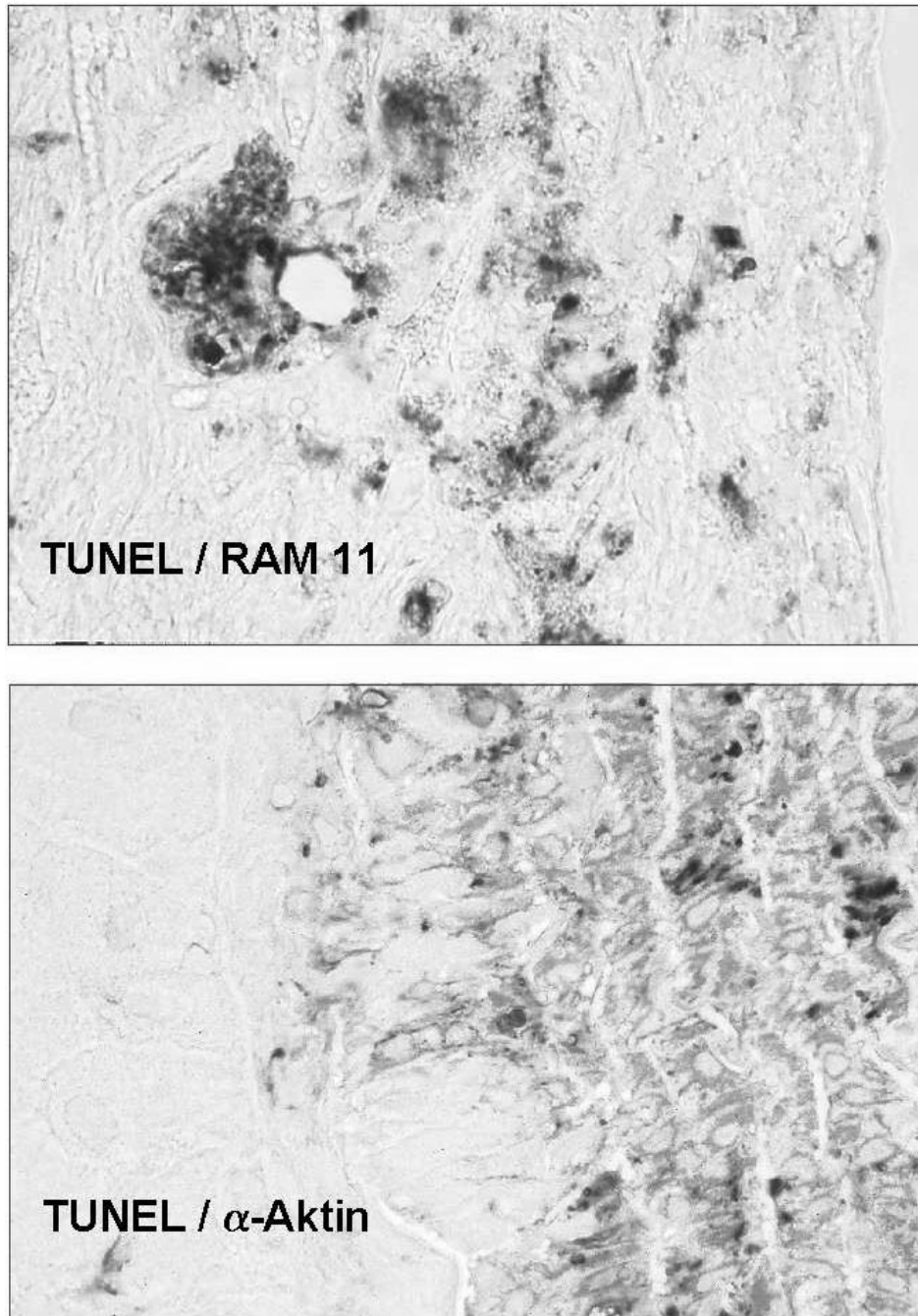


Abb. 9: Identifizierung TUNEL-positiver Zelltypen in Aorten aus genetisch-modifizierten Kaninchen. Aorta-Schnitte, die TUNEL-gefärbt (rot) wurden, wurden mit den Oberflächenmarkern RAM 11 für Makrophagen (A.) und α -Aktin für glatte Muskelzellen (B.) gegen gefärbt (blau).

4.1.3 Regulation von Bax, Bcl-2 und p53

Die Bcl-2-Familie besteht aus verschiedenen pro- und antiapoptotischen Mitgliedern. Das Verhältnis der proapoptotischen Familienmitglieder, wie z.B. Bax, zu den antiapoptotischen, wie z.B. Bcl-2, determiniert, ob eine Zelle überlebt.

4.1.3.1 Nachweis der Regulation von Bax und Bcl-2-Protein im Western Blot

Western Blot Analysen gegen Bax (Abb. 10 a+c) ergaben einen 18-fachen Anstieg von Bax Protein in genetisch induzierter Hyperlipidämie ($1823 \pm 1182\%$ im Vergleich zu Kontrolltieren). In durch Fütterung induzierter Hyperlipidämie konnte eine Verdopplung von Bax Protein ($227 \pm 87\%$) beobachtet werden. Im Gegensatz dazu änderte sich der Proteinlevel von Bcl-2 weder in genetischer Hyperlipidämie ($121 \pm 26\%$) noch durch Cholesterin-Diät ($101 \pm 70\%$, (Abb. 10 a+c)).

Das Verhältnis von Bcl-2 zu Bax betrug somit bei FFH-Kaninchen 1:16, bei H-Kaninchen 1:3,2. Um eine Beteiligung von p53 zu untersuchen, welches die Genexpression von Bax induzieren kann [122], wurden Western Blot Analysen mit einem Antikörper gegen p53 Protein durchgeführt. Wie in den Abbildungen 10b+c gezeigt, konnte jedoch keine signifikant veränderte p53-Expression in genetisch- und fütterungsinduzierter Hyperlipidämie ($118 \pm 34\%$ bzw. $105 \pm 38\%$) beobachtet werden.

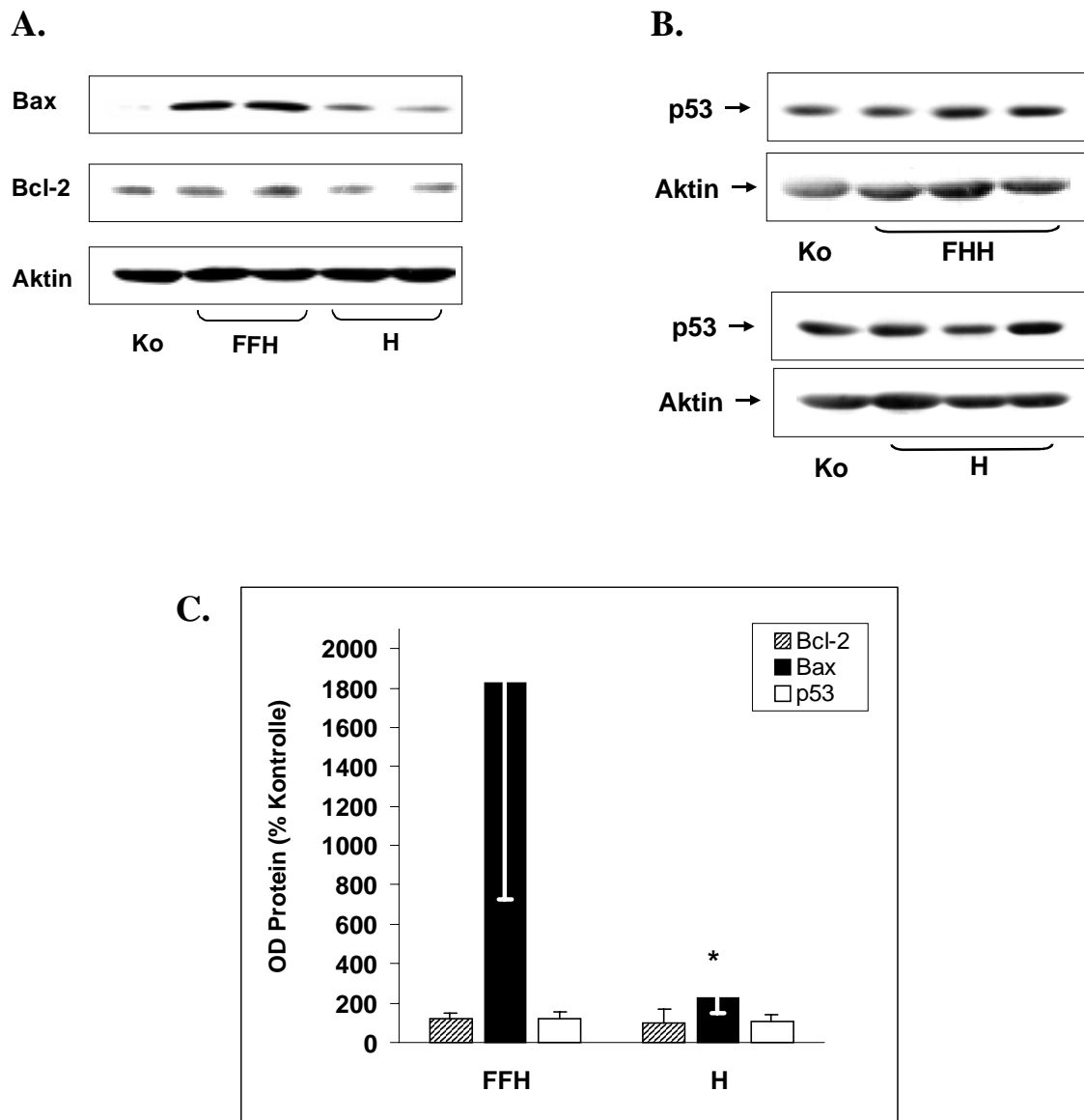


Abb. 10: Bax-, Bcl-2 und p53-Protein in der Hyperlipidämie. (A) Exemplarischer Western Blot gegen Bax und Bcl-2 sowie Aktin zur Verifizierung der Ladungsgleichheit. (B) Exemplarischer Western Blot gegen p53 und Aktin. (C) Densitometrische Auswertung der Western Blots. FFH = genetisch induzierte Hyperlipidämie, H = fütterungsinduzierter Hyperlipidämie (n=8 je Gruppe). Als Kontrolle wurden Aorten aus Wildtyp-Kaninchen mit normaler Diät (= Ko) analysiert (n=4). Mittelwert ± Standardabweichung (MW ± SD), * p < 0,05 im vgl. zu Bax FFH.

4.1.3.2 Immunhistochemische Identifizierung Bax-positiver Zellen

Da im Western Blot in genetisch induzierter Hyperlipidämie drastisch erhöhte Bax-Proteinlevel gezeigt werden konnten, sollte die Lokalisation der Bax exprimierenden Zellen in atherosklerotischen Plaques identifiziert werden. Immunhistochemische Färbungen gegen Bax zeigten, daß $70\pm 13\%$ der intimalen Zellen Bax-positiv waren, während in Kontrollen geringere Bax-Immunreaktivität vorhanden war ($13\pm 10\%$ von der Gesamtzellzahl). Bax-Immunreaktivität war hauptsächlich im superfiziellen Teil der Intima, der reich an Schaumzellen war, sowie in einigen Endothelzellen der Plaque-Oberfläche zu detektieren. Doppelfärbungen gegen Oberflächenmarker von glatten Muskelzellen (α -Aktin) oder Makrophagen (RAM 11) zeigten sowohl in glatten Muskelzellen als auch in Makrophagen Bax-Immunreaktivität (Abb. 12).

In immunhistochemischen Analysen von Aorten aus Kaninchen, die eine Cholesterin-Diät erhalten hatten, korrelierte der 2-fache Bax-Anstieg mit Bax-Immunreaktivität in Endothelzellen ($31\pm 14\%$, Abb. 11).

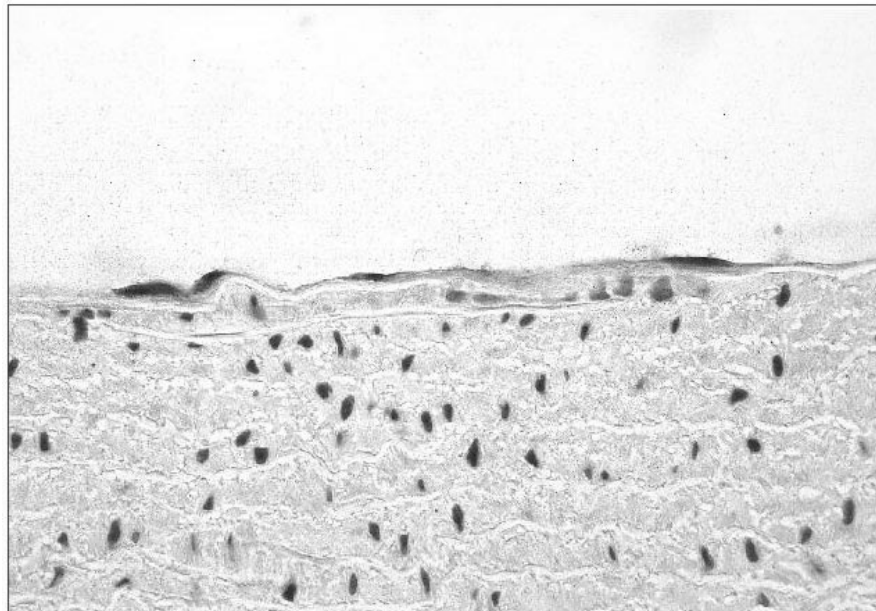


Abb. 11: Lokalisation Bax-immunreaktiver Zellen in Kaninchenaorten aus H-Tieren. Paraffinschnitte aus Aorten von mit Cholesterindiät gefütterten Kaninchen. Bax Immunreaktivität beschränkte sich auf die Endothelschicht.

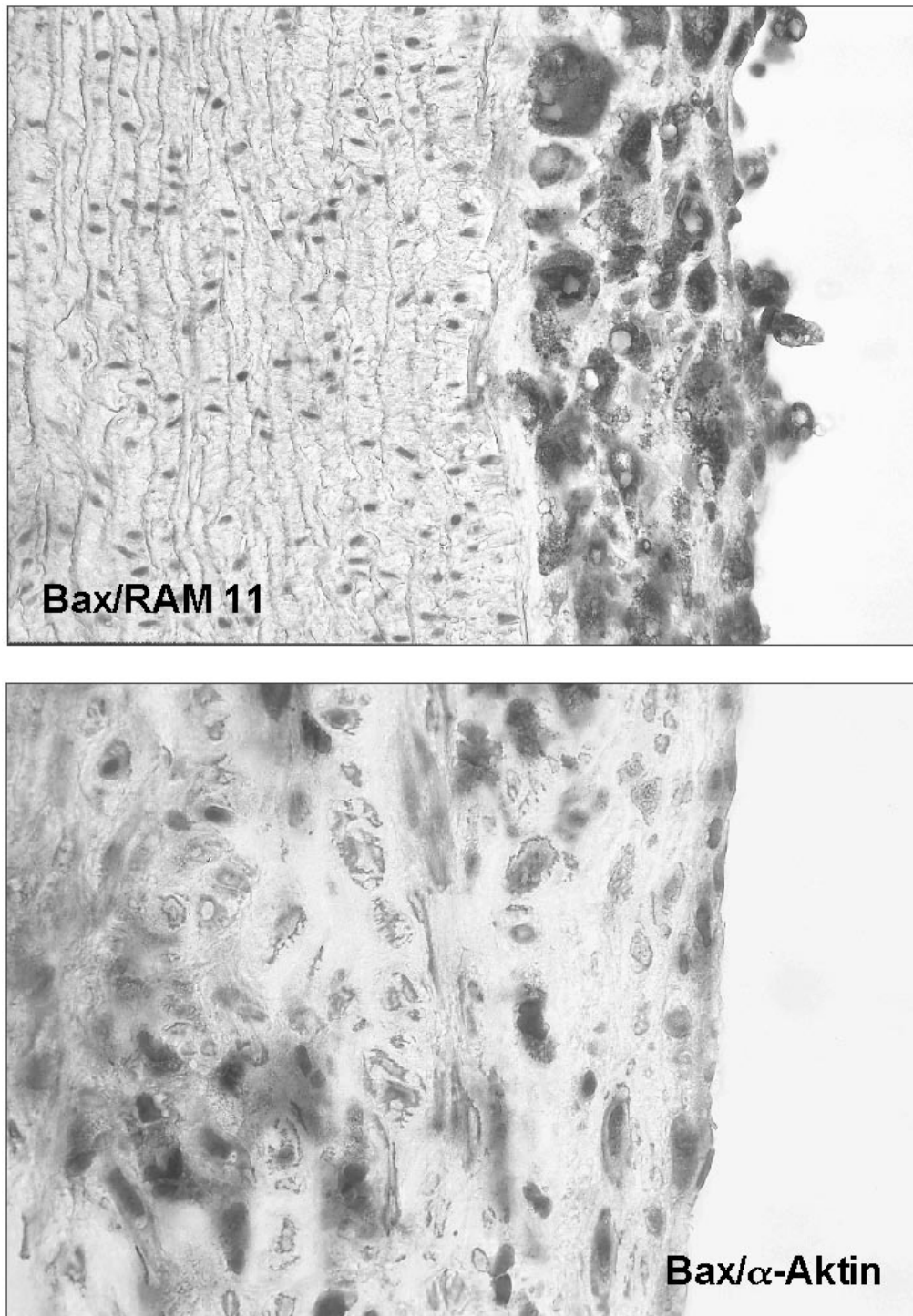


Abb. 12: Lokalisation Bax-immunreaktiver Zellen in Kaninchenaorten aus FFH-Tieren. Paraffinschnitte von Aorten aus FFH-Kaninchen wurden mit Bax (braun) gefärbt und mit Oberflächenmarkern gegen Makrophagen (RAM 11, *oben*) oder glatte Muskelzellen (Aktin, *unten*) gegen gefärbt (rot).

4.1.4 Serumlipide in genetisch und fütterungsinduzierter Hyperlipidämie

Hypercholesterinämie, insbesondere der Anteil der Lipoproteine LDL und HDL am Gesamtcholesteringehalt, werden für die Entstehung atherosklerotischer Läsionen verantwortlich gemacht.

Untersuchung der Serumlipide ergab, daß nach 12 Wochen sowohl in genetisch veränderten Kaninchen ($11,1 \pm 2,98$ mmol/l) als auch durch Cholesterin-Diät ($19,8 \pm 11,6$ mmol/l) Hypercholesterinämie induziert wurde (Tabelle 6), die sich in den Absolutwerten nicht signifikant voneinander unterschied. Dagegen zeigte sich durch unterschiedliche Induktion der Hyperlipidämie eine differierende Verschiebung der Lipoproteine LDL, HDL und VLDL am Gesamtcholesteringehalt (Tabelle 6 und Abb. 13).

Tabelle 6: Serum-Lipide in Kontrolltieren (n=4), Kaninchen mit Cholesterin-Diät (H, n=8) und genetisch induzierter Hyperlipidämie (FFH, n=8). Aufgelistet sind sowohl die Absolutwerte [mmol/l] als auch der (1) prozentuale Anteil der Lipoproteine am Gesamtcholesterin. (MW \pm SD, * p<0,05 gegen Kontrolltiere, # p<0,05 gegen FFH).

	Kontrolle		FFH		H	
	mmol/l	% -Anteil ¹	mmol/l	% -Anteil ¹	mmol/l	% -Anteil ¹
Gesamtcholesterin	0,95 \pm 0,43	100	11,1 \pm 3 *	100	19,8 \pm 11,6 *	100
LDL	0,19 \pm 0,09	20 \pm 2	8,4 \pm 2,2*	76 \pm 3*	8,5 \pm 6,5*	39 \pm 9* [#]
HDL	0,32 \pm 0,10	40 \pm 16	1,5 \pm 0,5*	14 \pm 1	2,7 \pm 0,5* [#]	18 \pm 7
VLDL	0,44 \pm 0,28	41 \pm 15	1,2 \pm 0,6*	11 \pm 3*	8,6 \pm 4,8* [#]	45 \pm 6* [#]
LDL/HDL	0,6 \pm 0,2		5,6 \pm 0,4		3,1 \pm 1,8	
Triglyceride	2,96 \pm 1,61	—	3,7 \pm 1	—	1,45 \pm 1,1	—

In Kontrolltieren fand man die in Tabelle 6 aufgezeigte Verteilung der Lipoproteine am Gesamtcholesterin. Genetisch induzierte Hyperlipidämie resultierte in einem 4-fachen Anstieg von LDL auf 76 \pm 3%, begleitet von einer 3-fachen bzw. 4-fachen Reduktion von HDL und VLDL auf 14 \pm 1% und 11 \pm 3%. Durch Cholesterin-Diät erhielt man eine

Verdopplung von LDL ($38\pm 9\%$) bei Halbierung von HDL ($18\pm 7\%$) und gleichbleibendem VLDL ($45\pm 6\%$).

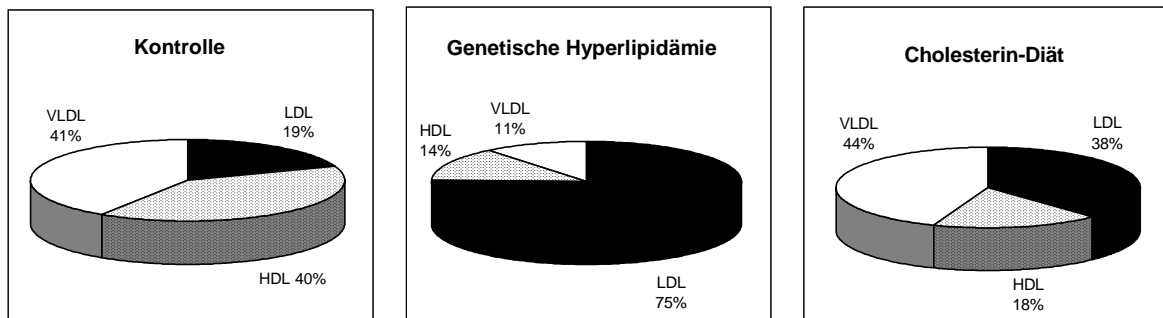


Abb. 13: Serum-Lipide, Zusammensetzung des Gesamtcholesterins. Prozentualer Anteil der Lipoproteine LDL (schwarz), HDL (grau) und VLDL (weiß) am Gesamtcholesteringehalt in Kontrolltieren, genetischer und durch Fütterung induzierter Hyperlipidämie.

4.2 Apoptose in der akuten Abstoßung von allogenen Herztransplantaten

Die Organtransplantation hat sich in den vergangenen Jahrzehnten zu einer etablierten therapeutischen Option im Terminalstadium des Organversagens entwickelt. Dabei stellt die akute Transplantatabstoßung neben der chronischen Transplantatdysfunktion eine bedeutende Komplikation dar. Um die Apoptose in der akuten Abstoßung von allogenen Herztransplantaten zu untersuchen, wurde das allogene, heterotope Herztransplantationsmodell von Wistar-Furth- zu Lewisratten verwendet ($n=15$, adulte, männliche Ratten).

4.2.1 Nachweis der Beteiligung von Apoptose

In der vorliegenden Arbeit wurde die Apoptose als Effektormechanismus der akuten Transplantatabstoßung untersucht. Um die Beteiligung der Apoptose in der akuten Abstoßung allogener Herztransplantate nachzuweisen, wurden zunächst immunhistochemische TUNEL-Färbungen durchgeführt (Abb. 14). Die akute Abstoßung resultierte in TUNEL-positiven Zellen mit typischer apoptotischer Morphologie und konnten als Kardiomyozyten identifiziert werden.

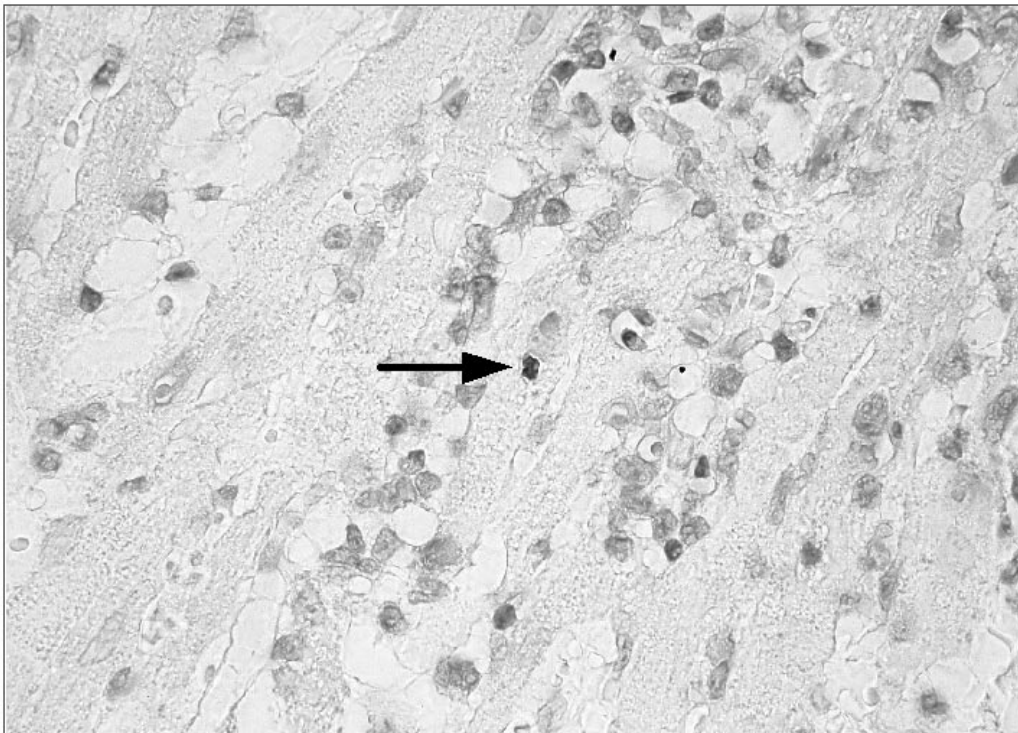


Abb. 14: In situ-Detektion apoptotischer Zellen (TUNEL-Färbung) in akut abgestoßenen Herz-Allotransplantaten. Gezeigt ist ein typischer Ausschnitt von Paraffinschnitten aus am Tag 10 akut abgestoßenen Transplantaten. Der Pfeil weist auf eine TUNEL-positive Zelle hin.

Die Ergebnisse der TUNEL-Färbung wurden durch Untersuchung der DNA-Fragmentierung in Gesamt-DNA verifiziert. Wie in Abb. 15 dargestellt, konnte am Tag 10 die DNA-Fragmentierung in eine typischen DNA-Leiter nachgewiesen werden.

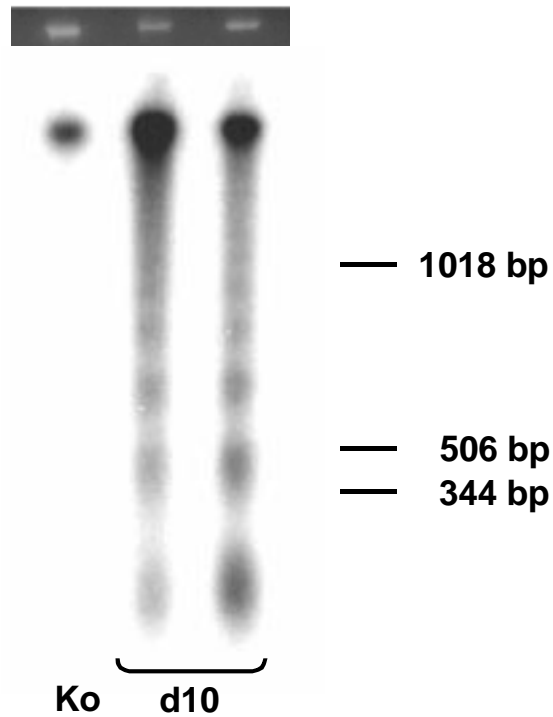


Abb. 15: Nachweis der DNA-Fragmentierung in der akuten Abstoßung allogener Herztransplantate (d10) durch radioaktive Markierung. Gesamt-DNA aus abgestoßenen Allotransplantaten wurde radioaktiv markiert. Dargestellt sind ein typisches Autoradiogramm (*unten*) sowie die Ethidiumbromid-Färbung (*oben*). bp = Basenpaare.

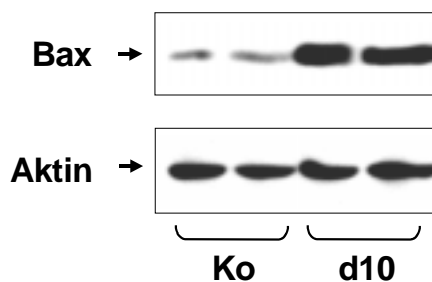
4.2.2 Regulation von Bax und Bcl-2

4.2.2.1 Regulation von Bax-Protein

Um die Regulation der Bcl-2-Familie in der akuten Abstoßung zu untersuchen, wurden exemplarisch Bax und Bcl-2 untersucht.

In Herzen, die am Tag 10 akut abgestoßen wurden, erhöhte sich die Menge an Bax Protein auf $327 \pm 124\%$ im Vergleich zu Kontrollherzen (Abb. 16).

A.



B.

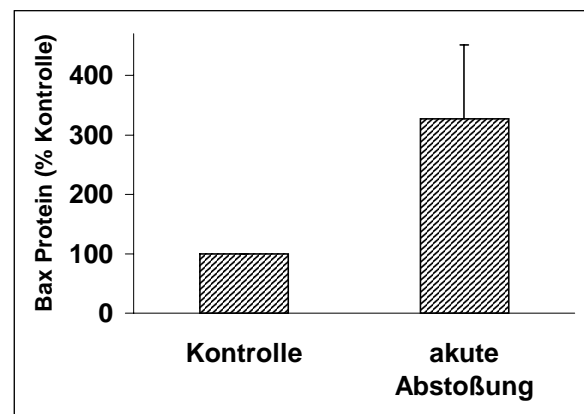


Abb. 16: Erhöhte Bax-Expression in der akuten Abstoßung allogener Herztransplantate. (A.) Western Blot gegen Bax. 50 µg Proteinhomogenat aus allogenen Herztransplantaten, die am Tag 10 akut abgestoßen wurden (= d10). Als Kontrolle wurden unbehandelte Herzen verwendet (= Ko). (B.) Densitometrische Auswertung der Western Blots (MW±SD aus n=8 Tieren)

4.2.2.2 Zeitabhängige Regulation von Bcl-2-Protein

Die akute Abstoßung resultierte in einer zeitabhängigen Verminderung von Bcl-2-Protein (Tag 1: 100%, Tag 3: 51%, Tag 5: 9%, Abb. 17 a und b). Am Tag 7 und Tag 10 akut abgestoßener Herzen wurde ein Degradationsprodukt von 17 kD im Western Blot sichtbar (siehe Abb. 17 c), während kein Bcl-2 mehr zu detektieren war.

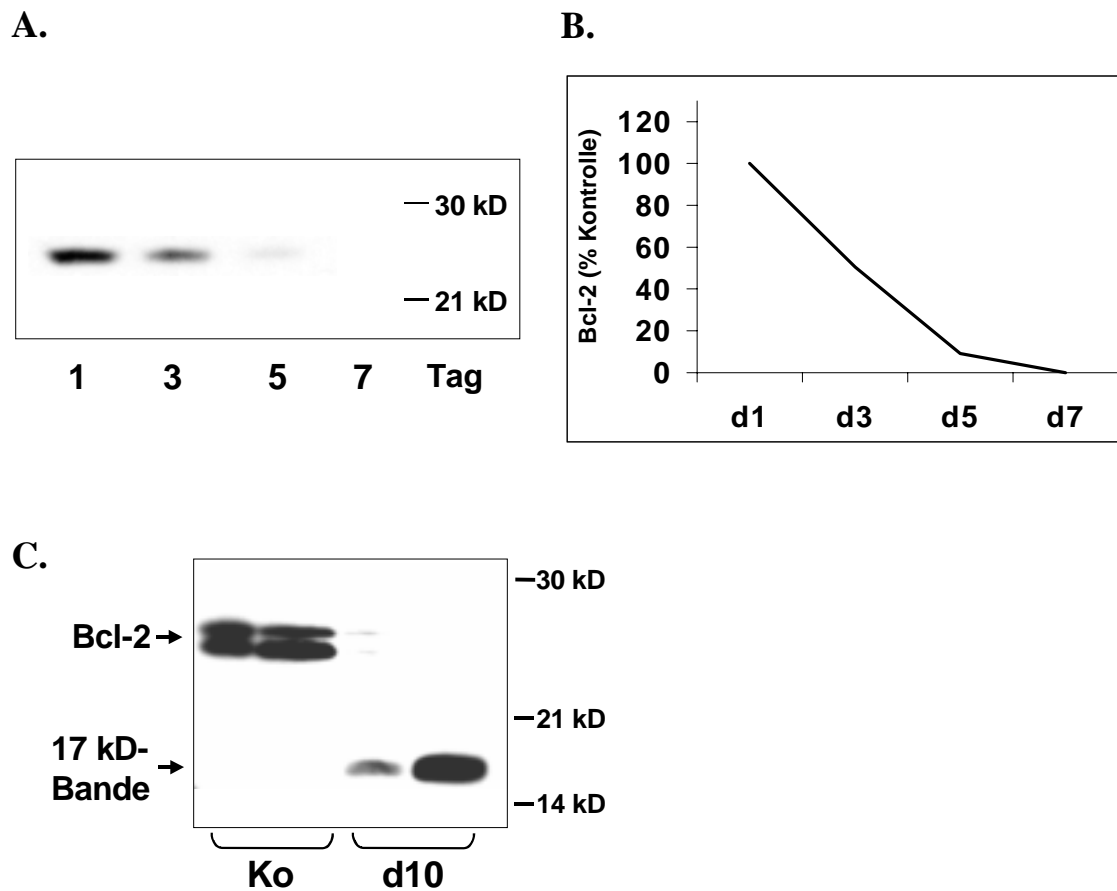


Abb. 17: Zeitabhängige Degradation von Bcl-2 in der akuten Abstoßung allogener Herztransplantate. (A.) Western Blot gegen Bcl-2. 50 µg Proteinhomogenat aus allogenen Herztransplantaten, die am Tag 1, 3, 5 und 7 abgestoßen wurden. (B.) Densitometrische Auswertung der Zeitkinetik, Bcl-2 Gehalte in unbehandelter Kontrolle wurden als 100% definiert. (C.) Western Blot gegen Bcl-2. 50 µg Protein aus abgestoßenen Herzen am Tag 10 (= d10). Als Kontrolle dienten Herzen unbehandelter Ratten (= Ko).

4.2.2.3 Einfluß auf die Bcl-2 Protein mRNA-Expression

Reduzierte Bcl-2 Proteinlevel in der akuten Abstoßung könnten entweder auf verminderte Transkription oder auf posttranslationale Veränderungen zurückzuführen sein. Deshalb wurde ein „*RNase Protection Assay*“ (siehe Material & Methoden) mit multiplen Proben durchgeführt, der es ermöglicht, verschiedene mRNA-Spezies gleichzeitig zu detektieren und zu quantifizieren.

Wie in Abb. 18 dargestellt, konnte in der akuten Abstoßung (d10) keine Veränderung der Genexpression der Bcl-2 Familienmitglieder Bcl-2 und Bax beobachtet werden. Die Expression von L32 und GAPDH verifizieren Ladungsgleichheit.

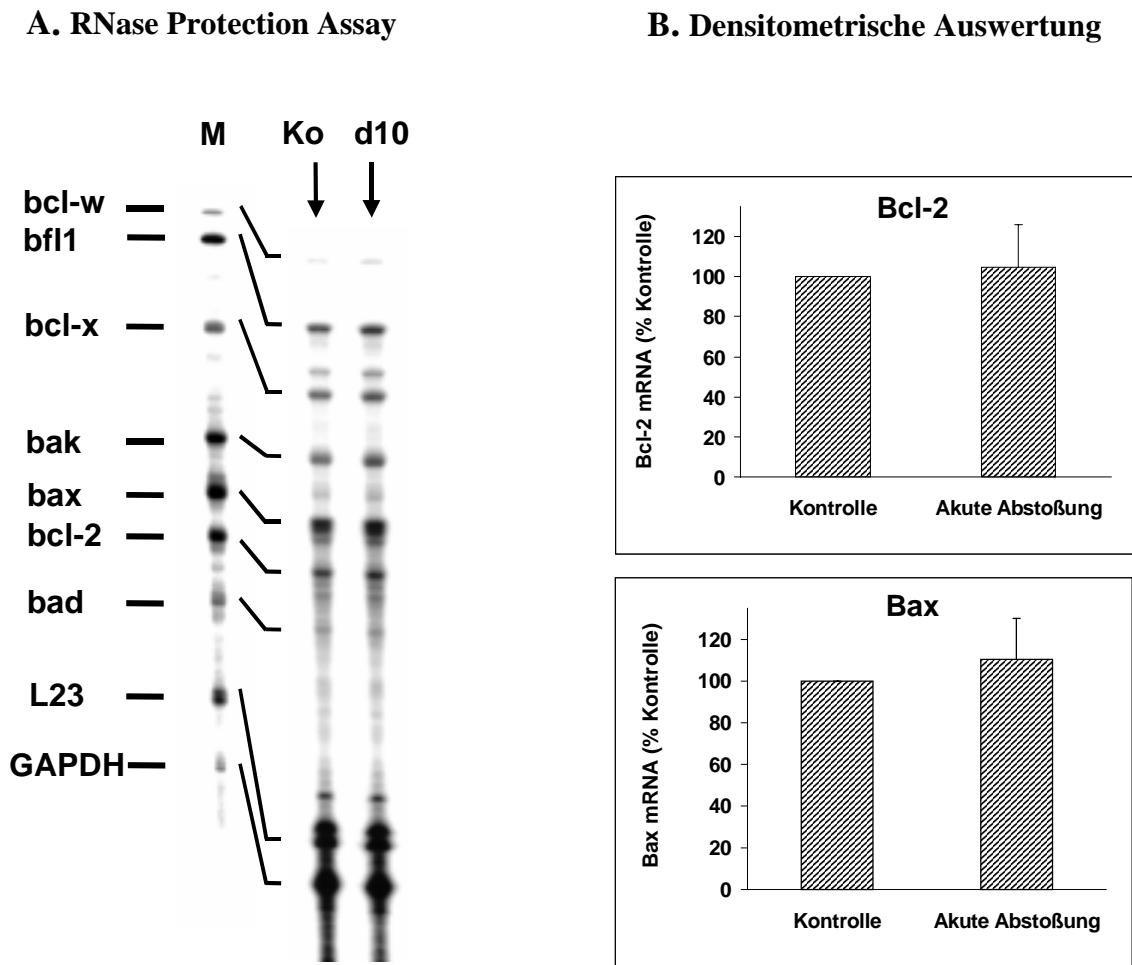


Abb. 18: Die Bcl-2 Proteolyse in der akuten Abstoßung findet nicht auf transkriptioneller Ebene statt (RNase-Protection-Assay). (A.) Dargestellt ist ein typisches Autoradiogramm. M = Marker, Ko = mRNA aus unbehandelten Kontrollherzen, d10 = mRNA aus akut abgestoßenen Herzen. (B.) Quantifizierung von Bcl-2 und Bax mittels Phosphorimager-Analysen (Beckmann).

4.2.2.4 Charakterisierung der Bcl-2 Degradation

Die Ergebnisse des RNase Protection Assays wiesen auf eine posttranslationale Degradation von Bcl-2 hin. Um die Proteolyse näher zu charakterisieren, wurde in einem in vitro-Assay [^{35}S]-markiertes Bcl-2 mit Proteinhomogenaten aus Kontrollherzen bzw. Herzen, die am Tag 10 akut abgestoßen wurden, koinkubiert. Wie im Western Blot wurde Gesamtlängen-Bcl-2 in akut abgestoßenen Herzen bei 37°C Inkubationstemperatur vollständig degradiert ($2,4\pm 1,3\%$ im vgl zu 4°C) und in ein Degradationsprodukt von 17 kD gespalten, während in der Kontrolle (Inkubation bei 4°C) keine Degradation von Bcl-2 zu beobachten war ($104\pm 30\%$, Abb. 19).

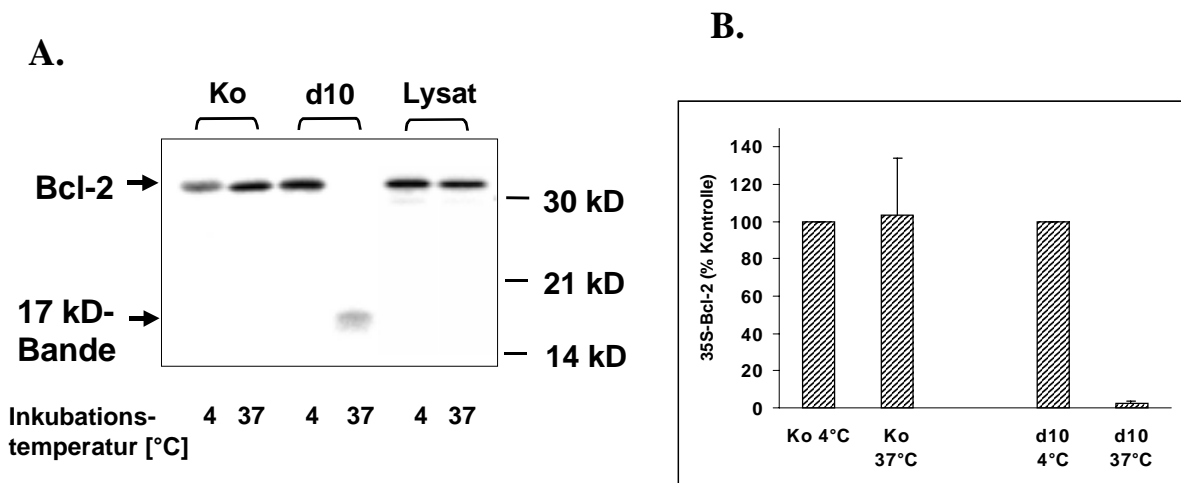


Abb. 19: Abbau von [^{35}S]-markierten Bcl-2 in der akuten Abstoßung. (A.) Rekombinantes Bcl-2 wurde radioaktiv markiert (siehe Material & Methoden) und mit 100 μg Proteinhomogenat aus Kontrollherzen (= Ko) oder am Tag 10 akut abgestoßener Herzen (= d10) koinkubiert. Als zusätzliche Kontrolle wurde [^{35}S]-Bcl-2 ohne Proteinhomogenate inkubiert (= Lysat). (B.) Densitometrische Auswertungen der Autoradiogramm, MW \pm SD.

Zur Charakterisierung der Bcl-2 Proteolyse in der akuten Abstoßung wurden folgende Protease-Inhibitoren verwendet (Tab. 7):

Tabelle 7: Übersicht der eingesetzten Protease-Inhibitoren und Konzentrationen.

Protease-Familie	Inhibitor	Konzentration	
SERIN-PROTEASEN	Aprotinin	1 µg/ml	
	Leupeptin	1 µg/ml	
	• Perforine	ConcanamycinA	0,5 µM
	• Granzyme B	Granzyme B-Inhibitor	5 µM
CYSTEIN-PROTEASEN			
• allgemein	E64	5 µg/ml	
	Leupeptin	1 µg/ml	
	PMSF	2 mM	
	N-Ethylmaleimide (NEM)	2 mM	
	Jodacetamid	1 mM	
• Calpaine	Calpain I-Inhibitor	5 µg/ml	
	Calpain II-Inhibitor	5 µg/ml	
• Caspasen	ZVAD-fmk	100 µM	
	Ac-DEVD-CHO	100 µM	
• Proteasomenkomplex	ZLLLH	40 µM	
METALLO-PROTEASEN	EDTA	50 mM	
ASPARTAT-PROTEASEN	Pepstatin	10 µg/ml	

Die Familie der Serin-Proteasen konnte als die für die Degradation verantwortliche Proteasefamilie identifiziert werden, da sowohl der Serin-/Cysteinproteaseninhibitor Leupeptin ($72\pm 16\%$ im Vergleich zu d10 4°C) als auch der spezifischere Serinproteaseninhibitor Aprotinin ($110\pm 16\%$) die Bcl-2 Degradation inhibierte (Abb. 20 a+c). Der Cysteinproteaseninhibitor E64 ($21\pm 20\%$) hatte ebenso wenig einen Effekt auf die Bcl-2 Proteolyse wie die Hemmung der Metallo- und Aspartat-Proteasen mit EDTA und Pepstatin (Abb. 20 b+c).

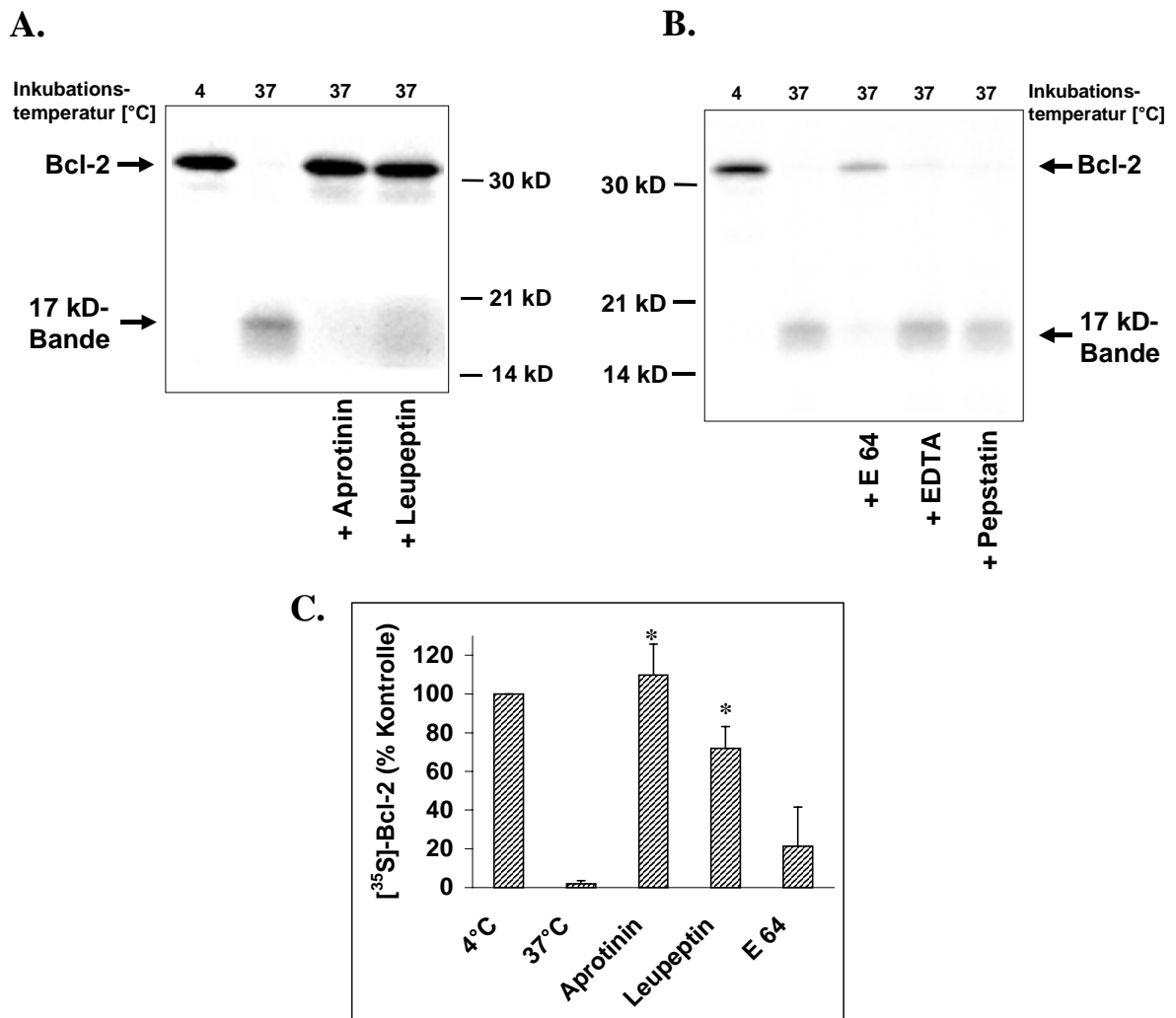


Abb. 20: Einfluß von Proteaseinhibitoren auf die Bcl-2 Proteolyse in der akuten Abstoßung. Jeweils $100\ \mu\text{g}$ Proteinhomogenat aus am Tag 10 akut abgestoßenen Herzen wurde mit Inhibitoren der verschiedenen Proteasefamilien (eingesetzte Konzentrationen: siehe Tab. 7) und [^{35}S]-markierten Bcl-2 koinkubiert. (A.) und (B.) Typische Autoradiogramme. (C.) Densitometrische Auswertung. $n=3$, $\text{MW}\pm\text{SD}$. * $p<0,05$ zu 37°C .

Hemmung der Cystein-Proteasen mit anderen unspezifischen Inhibitoren wie NEM und Jodacetamid zeigten keinen Effekt auf die Bcl-2 Proteolyse (Abb. 21 a). Es ist bekannt, daß Bcl-2 durch Caspasen [30] und den Proteasomenkomplex [40] gespalten werden können. Jedoch konnten die Caspasen-Inhibitoren ZVAD und DEVD (Abb. 21 b) die Bcl-2 Proteolyse nicht hemmen. Weiterhin hatte die Inhibition des Proteasomenkomplexes mit ZLLLH und der Calpainproteasen mit Calpain I- und Calpain II-Inhibitor keinen Einfluß auf die Bcl-2 Degradation (Abb. 21 c).

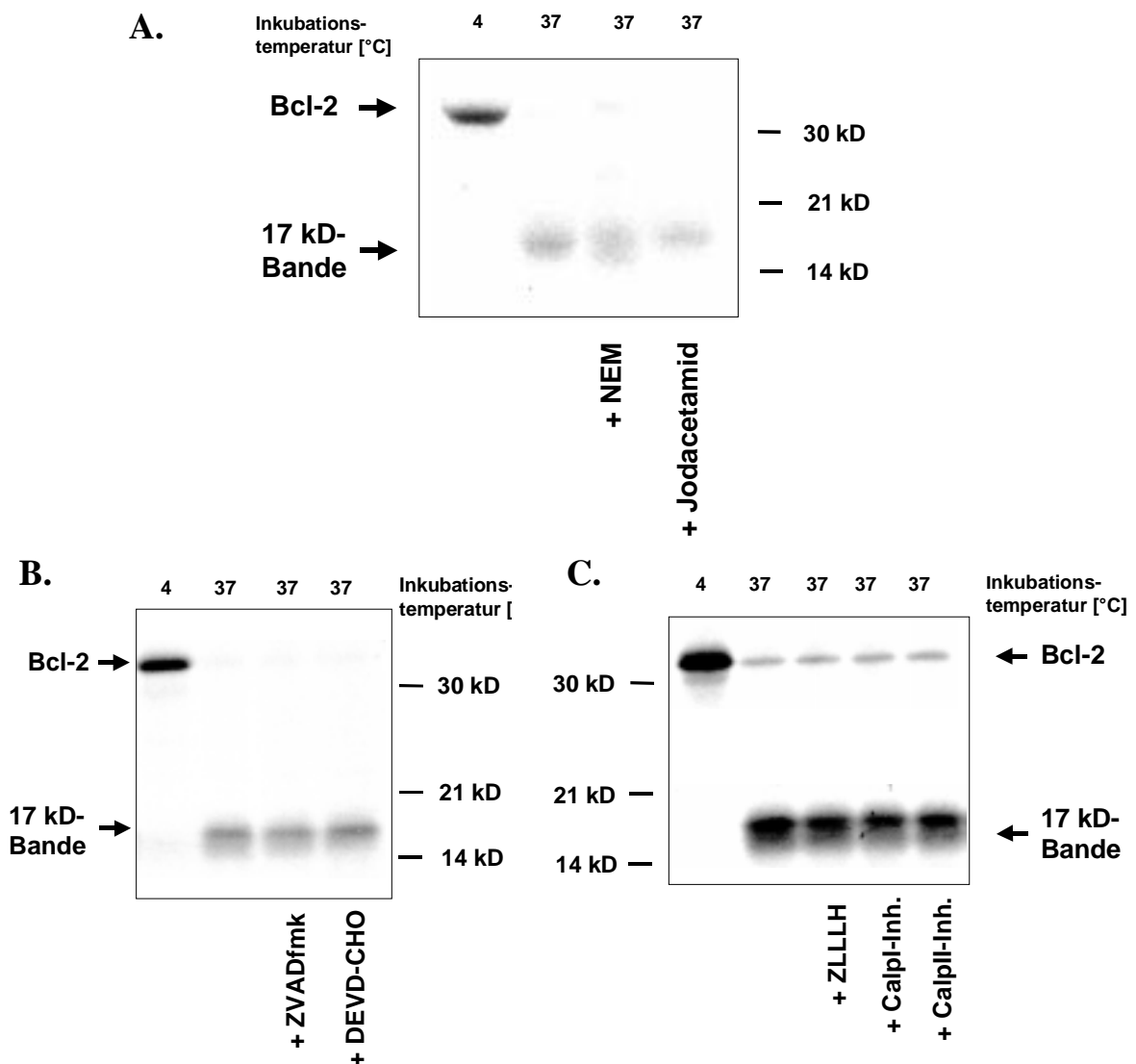


Abb. 21: Einfluß von Cysteinprotease-Inhibitoren auf die Bcl-2 Proteolyse in der akuten Abstoßung. [³⁵S]-markierten Bcl-2 wurde mit jeweils 100 µg Proteinhomogenat aus am Tag 10 akut abgestoßenen Herzen sowie mit unspezifischen Inhibitoren der Cysteinproteasen (A.) oder mit spezifischeren Inhibitoren der folgenden Cysteinproteasen koinkubiert: (B.) Caspase-Inhibitoren, (C.) Inhibitoren des Proteasomenkomplexes (ZLLLH) und der Calpaine (CalpI/CalpII-Inhibitor). Eingesetzte Konzentrationen: siehe Tab.7. Dargestellt sind typisches Autoradiogramme.

Serinproteasen, wie Granzyme B, spielen eine Rolle in der durch zytotoxische T-Zellen (CTL) vermittelten Immunantwort in der akuten Abstoßung, welche hauptsächlich über Fas/Fas Ligand und Perforin/Granzyme B Apoptose in Zielzellen induzieren. So konnte eine partielle Hemmung der Bcl-2-Degradation durch Inhibition der Perforin-Porenbildung mit ConcanamycinA ($41 \pm 8\%$) erreicht werden, während Hemmung der Serinprotease Granzyme B keinen Effekt hatte ($11 \pm 7\%$, Abb.22).

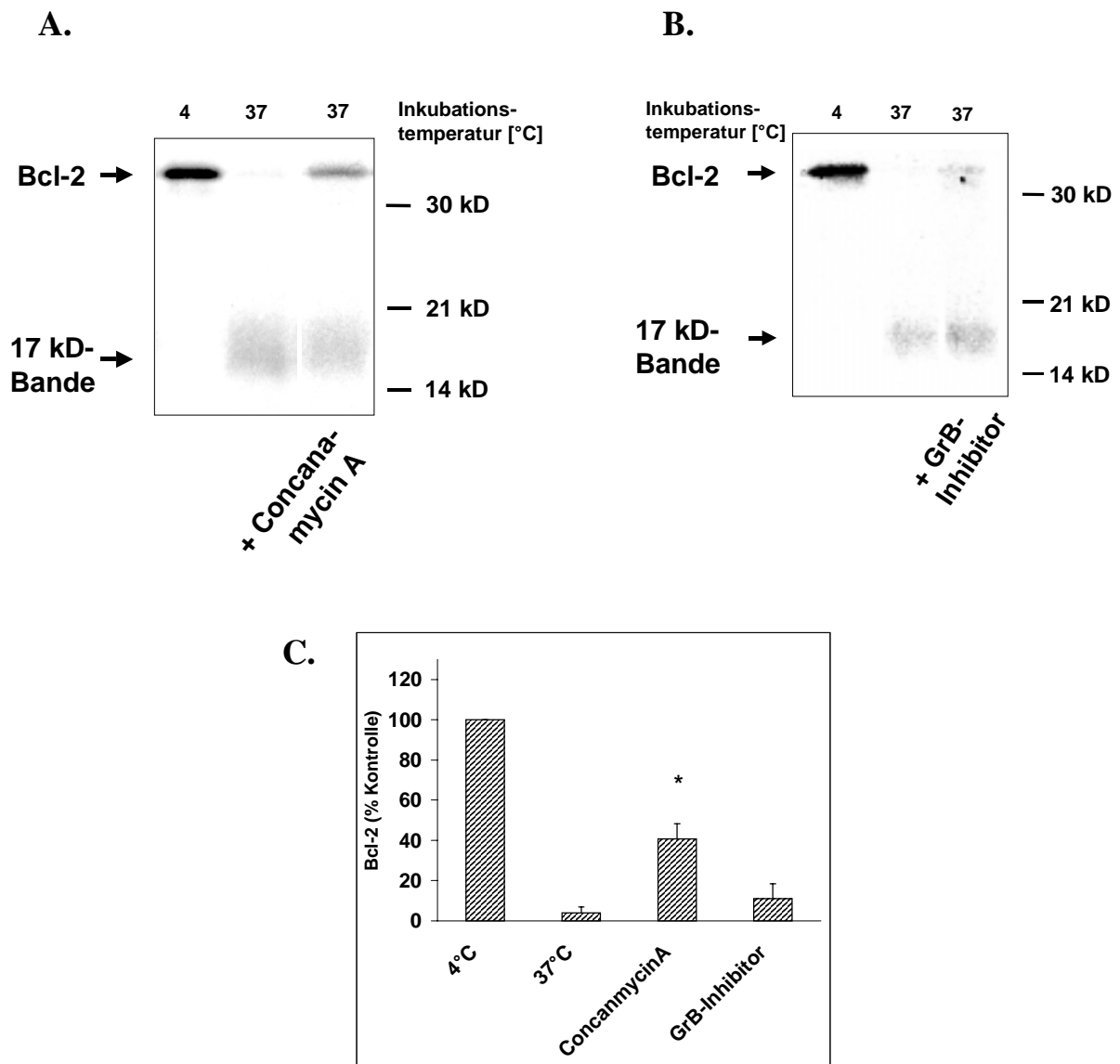


Abb. 22: Partielle Hemmung der Proteolyse von [³⁵S]-Bcl-2 durch Inhibitor von Perforin. [³⁵S]-markiertes Bcl-2 wurde mit jeweils 100 µg Proteinhomogenat aus am Tag 10 akut abgestoßenen Herzen und mit 1 µM Concanamycin A (**A**) oder 5 µM Granzyme B-Inhibitor (**B**) koinkubiert. (**C**) Densitometrische Auswertung der Autoradiogramme. n=2, MW±SD.* p<0,05 zu 37°C.

Antioxidantien [58] und Stickstoffmonoxid [38] konnten in HUVEC die Bcl-2 Degradation hemmen. Deshalb wurde zunächst die Beteiligung redoxabhängiger Prozesse an der Bcl-2 Proteolyse in akut abgestoßenen Herzen untersucht. Wie in Abbildung 23 dargestellt, hatten weder die Kombination von Vitamin C+E noch Cyclosporin A einen Effekt. Dagegen resultierte der Schutz von SH-Gruppen mit DTT in einer Hemmung der Bcl-2 Proteolyse.

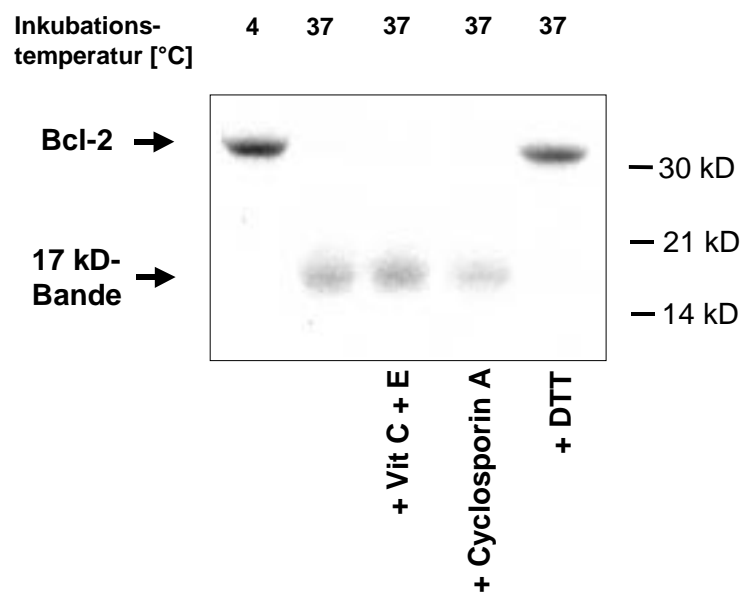


Abb. 23: Einfluß redoxabhängiger Prozesse auf die Bcl-2 Proteolyse in der akuten Abstoßung. Koinkubation [^{35}S]-markierten Bcl-2 mit 100 μg Proteinhomogenat aus am Tag 10 akut abgestoßenen Herzen und mit Inhibitoren redoxabhängiger Prozesse.

Koinkubation mit Stickstoffmonoxid resultierte in einer dosisabhängigen Hemmung der Bcl-2 Degradation in der akuten Abstoßung. So konnte nur die höchste eingesetzte Konzentration (1mM) des NO-Donors S-Nitrosopenicillamine (SNAP) die Degradation hemmen, während niedrigere Konzentrationen keinen Effekt hatten (Abb. 24).

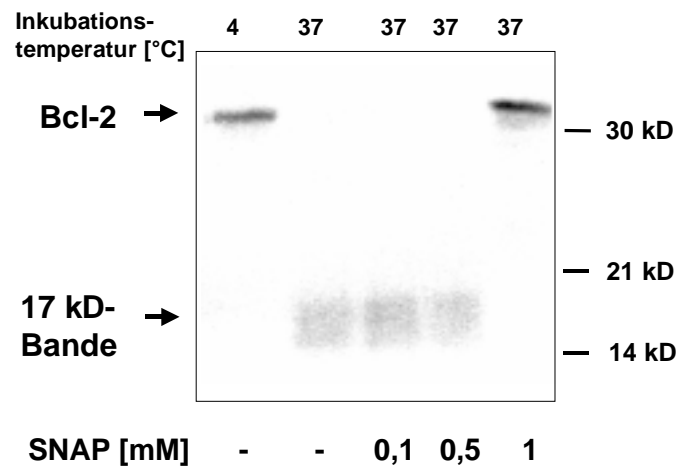



Abb. 24: Dosisabhängige Effekte von NO auf die Bcl-2 Proteolyse in der akuten Abstoßung. Koinkubation [35 S]-markierten Bcl-2 mit 100 μ g Proteinhomogenat aus am Tag 10 akut abgestoßenen Herzen und mit den angegebenen Konzentrationen des NO-Donors S-Nitrosopenicillamine (SNAP).

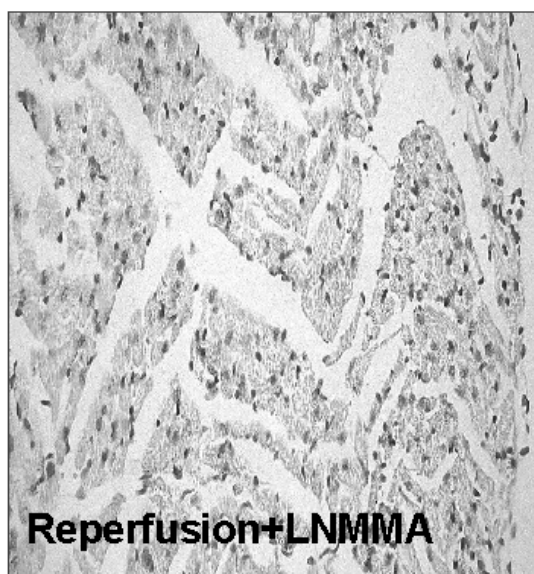
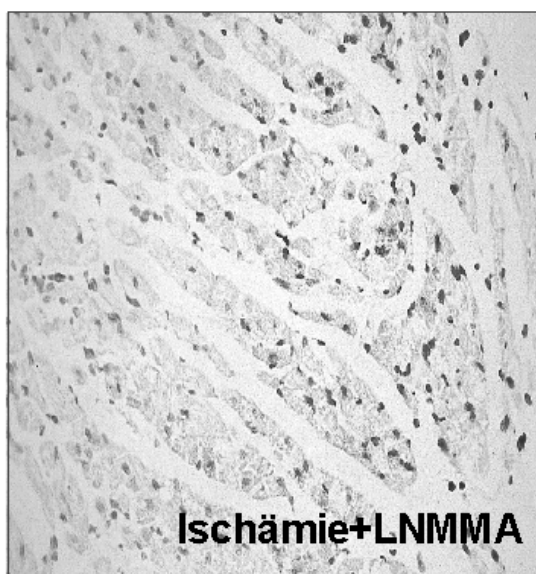
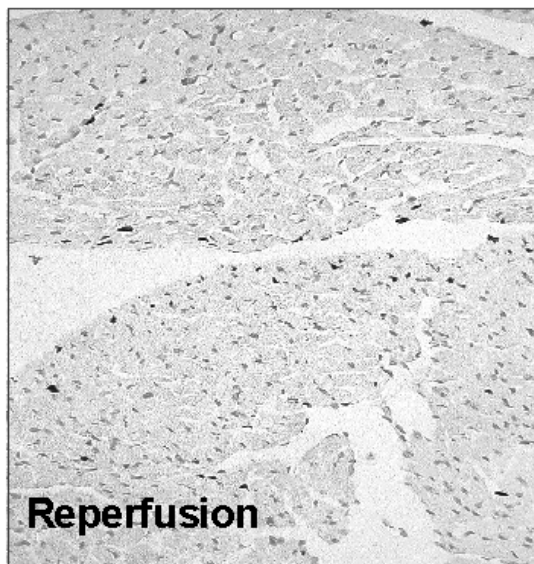
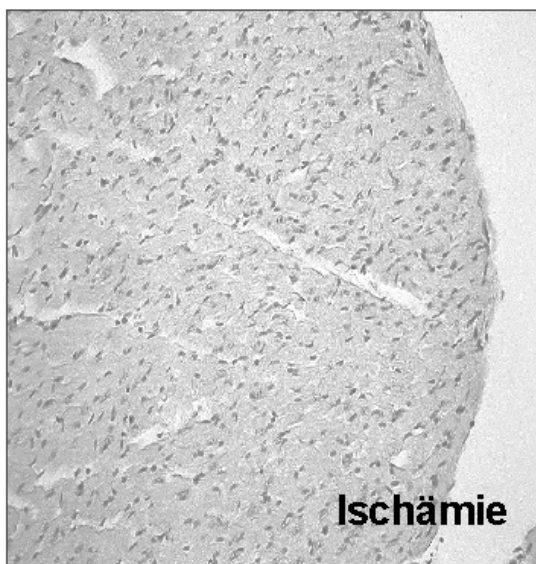
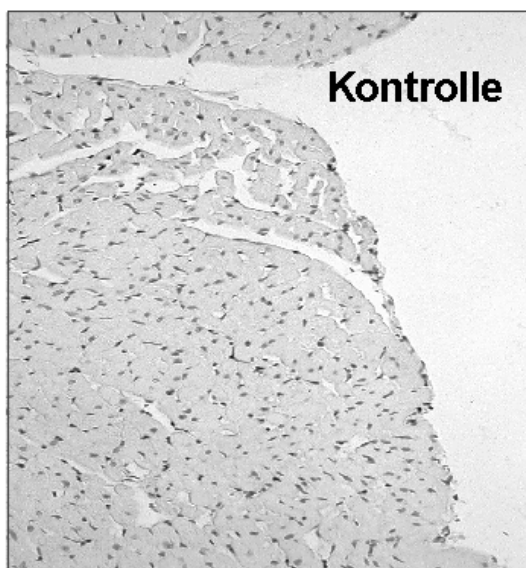
4.3 Untersuchung der Apoptose in Ischämie/Reperfusion

Der Einfluß von Stickstoffmonoxid (NO) auf die Apoptose wird kontrovers diskutiert. Einige Studien zeigen proapoptotische Effekte von NO, während neuere Untersuchungen auch auf antiapoptotische Effekte hinweisen. So konnte gezeigt werden, daß Stickstoffmonoxid durch verschiedene Stimuli (wie TNF α und Angiotensin II) induzierte Apoptose hemmt [59, 35]. Um die physiologische Relevanz protektiver Effekte endogenen Stickstoffmonoxids zu überprüfen, wurde Ischämie/Reperfusion-induzierte Apoptose an isolierten perfundierten Rattenherzen (jeweils 30 Minuten Ischämie und Reperfusion, n=6 pro Versuchsgruppe, Herzen männlicher alters-/gewichtsdefinierter Wistar-Furth Ratten) in der Langendorff-Apparatur untersucht.

4.3.1 Apoptose in Ischämie/Reperfusion

Der immunhistochemische Nachweis der für die Apoptose charakteristischen DNA-Fragmentierung ergab, daß in der Ischämie ein geringer Anstieg TUNEL-positiver Zellen ($0,13\pm 0,2\%$ der Gesamtzellzahl im vgl. zu $0,12\pm 0,11\%$ in Kontrollherzen) zu detektieren war und zusätzliche Reperfusion in einem 8-fachen Anstieg TUNEL-positiver Zellen ($0,99\pm 1,69\%$) resultierte (Abb.25).

Abb. 25: In situ-Detektion apoptotischer Zellen (TUNEL) in Rattenherzen. Gezeigt sind typische Ausschnitte von Paraffinschnitten (n=6 pro Gruppe). Der Anteil TUNEL-positiver Zellen (rot) an der Gesamtzellzahl wurde unter Berücksichtigung der Morphologie im Lichtmikroskop quantifiziert. 



Diese Ergebnisse wurden durch Nachweis der typischen DNA-Leiter (Abb. 26) bestätigt. In der Ischämie war nur eine geringe Fragmentierung erkennbar, die in der Reperfusion verstärkt wurde.

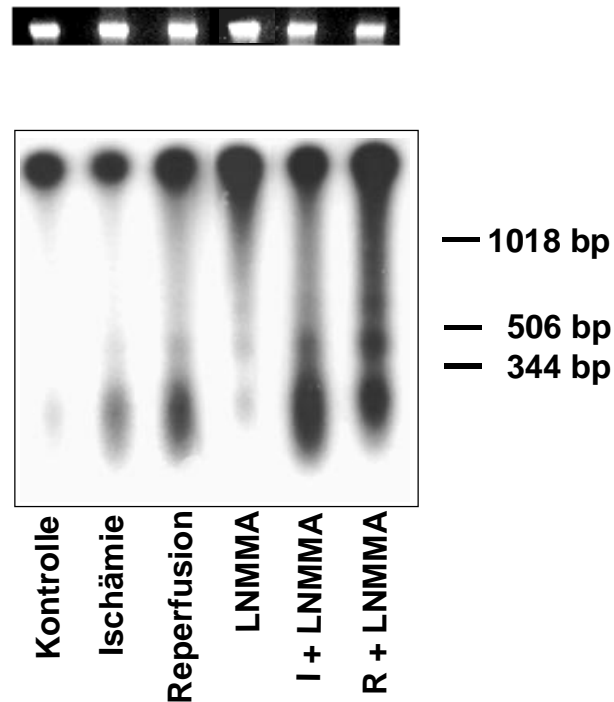


Abb. 26: Nachweis der DNA-Fragmentierung in Ischämie und Reperfusion durch radioaktive Markierung. Gesamt-DNA aus Rattenherzen wurde radioaktiv markiert und im Agarosegel aufgetrennt. Dargestellt ist ein typisches Autoradiogramm (*unten*). Die Ethidiumbromid-Färbung verifiziert die Ladungsgleichheit (*oben*). I = Ischämie, R = Reperfusion, 1mM LNMMA. bp = Basenpaare.

4.3.2 Bedeutung von endogenem NO auf Ischämie/Reperfusions-induzierte Apoptose

Um die Bedeutung des endogenen NO zu untersuchen, wurde die NO-Synthase in Ischämie und Reperfusion durch den Zusatz des kompetitiven Inhibitor L-N^G-Monomethyl-L-arginin (LNMMA, 1mM) zur Perfusionslösung gehemmt. Die Inhibition der endogenen NO-Synthase resultierte in einer starken Induktion der Apoptose in der

Ischämie ($31 \pm 7\%$ TUNEL-positiver Zellen) sowie einer Verstärkung bei zusätzlicher Reperfusion ($27 \pm 19\%$, Abb. 25).

Die Überprüfung der immunhistochemischen Ergebnisse durch den Nachweis der DNA-Leitern ergab eine starke Fragmentierung der DNA bei Perfusion mit LNMMA sowohl in der Ischämie als auch in der zusätzlicher Reperfusion (Abb. 26). Die Hemmung der endogenen NO-Synthese ohne zusätzliche Ischämie und Reperfusion resultierte in einer geringeren Fragmentierung.

4.3.3 Bedeutung von Bcl-2 und Bax

Um die Beteiligung der Bcl-2-ähnlichen Proteine zu ermitteln, wurden Bcl-2 und Bax Protein im Western Blot untersucht (Abb. 27).

Bcl-2-Proteinlevel wurden weder durch Ischämie ($92 \pm 52\%$ im Vgl. zu Kontrollherzen) noch durch Reperfusion ($185 \pm 96\%$) reguliert. Die Hemmung der endogenen NO-Synthese in Ischämie ($178 \pm 67\%$) und Reperfusion ($189 \pm 11\%$) führte ebenfalls zu keiner Änderung von Bcl-2-Protein. Die Untersuchung von Bax-Protein zeigte ähnliche Ergebnisse. Weder Ischämie ($97 \pm 6\%$) und Reperfusion ($87 \pm 12\%$) noch zusätzliche Hemmung der endogenen NO-Synthese in Ischämie ($81 \pm 19\%$) und Reperfusion ($79 \pm 25\%$) führten zu einer veränderten Bax-Expression.

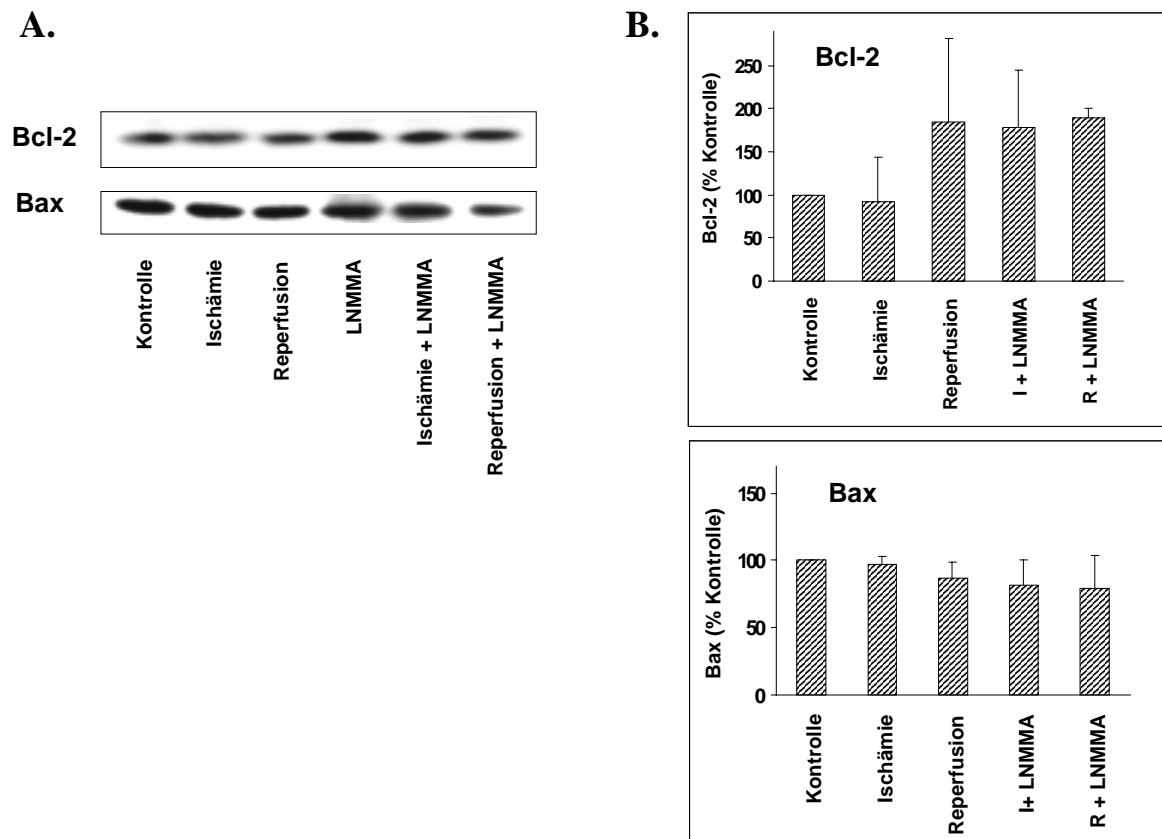


Abb. 27: Bax und Bcl-2 Protein werden in Ischämie und Reperfusion nicht reguliert. (A.) 50 µg der Proteinhomogenate jeder Gruppe wurden im 12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. (B.) Densitometrische Auswertung der Western Blots gegen Bax und Bcl-2. LNMMA 1 mM. I = Ischämie, R = Reperfusion. n=6 je Gruppe, MW±SD.

4.3.4 Bedeutung der Caspase-3 in der Ischämie/Reperfusions-induzierten Apoptose

Die proteolytische Caspase-Kaskade ist an der Apoptose-Signaltransduktion verschiedener apoptotischer Stimuli beteiligt. Die Caspase-3 steht am Ende dieser Kaskade und führt über Aktivierung der Caspase-3-abhängigen DNase I (CAD) zur DNA-Fragmentierung. Bei Aktivierung der Caspase-3 kommt es zur proteolytischen Spaltung in die Untereinheiten p17 und p12, welche dann zum enzymatisch aktiven Komplex dimerisieren. In vitro- und Zellkulturversuche [59, 153] weisen darauf hin, daß protektive NO-Effekte auf posttranslationale Modifikation der Caspase-3 zurückzuführen sind. Deshalb sollte

untersucht werden, ob die Apoptose in Ischämie und Reperfusion einen Einfluß auf das Caspase-3 Protein hat.

4.3.4.1 Nachweis der proteolytischen Spaltung von Caspase-3 im Western Blot

Im Western Blot gegen die aktive Untereinheit p17 konnte gezeigt werden, daß Reperfusion in einem leichten Anstieg von p17 als Indikator für die Aktivierung von Caspase-3 resultierte (Abb. 28). Durch Hemmung der endogenen NO-Synthese kam es zu keiner Spaltung der Caspase-3 in p17, während zusätzliche Ischämie und Reperfusion zur Spaltung in die p17-Untereinheit führten.

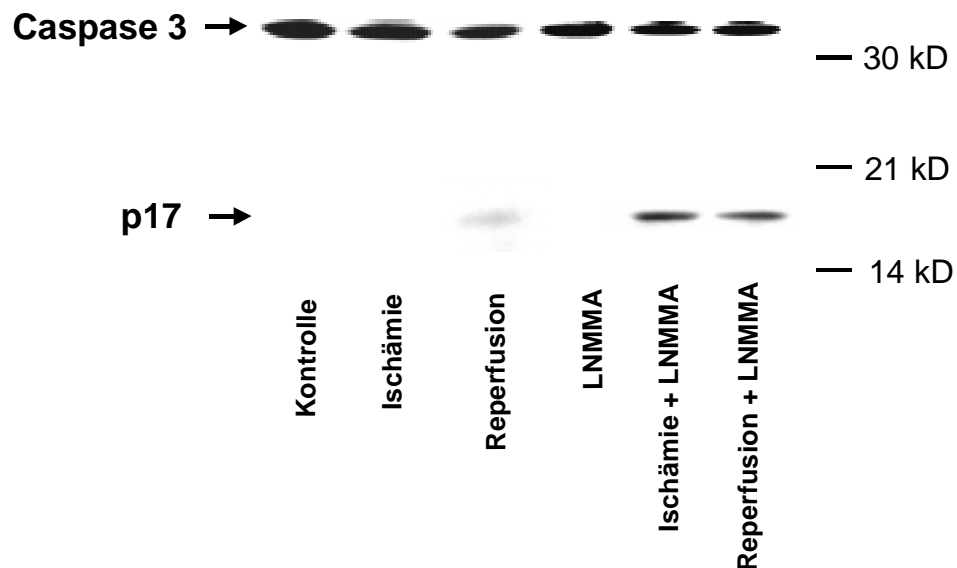


Abb. 28: Nachweis der proteolytischen Spaltung der Caspase-3 in Ischämie und Reperfusion im Western Blot. 100 µg der Proteinhomogenate jeder Gruppe wurden im 15% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und Western Blots gegen die aktive Untereinheit p17 durchgeführt.

4.3.4.2 Nachweis der endogenen Caspase-Spaltungsaktivität

Der Western Blot demonstriert die Anwesenheit von p17, kann aber keine Enzymaktivität detektieren. Um die endogene Caspase-Aktivität in Proteinhomogenaten der Rattenherzen zu detektieren, wurde ein radioaktiver in vitro-Assay etabliert (siehe Material & Methoden).

Bei Inkubation [³⁵S]-markierter Caspase-3 mit Proteinextrakten aus anti-Fas stimulierten Jurkat-Zellen erhielt man das Spaltprodukt p17 (Abb. 29). Koinkubation von radioaktiv markierter Caspase-3 mit Homogenaten aus Ischämie/Reperfusion unter Hemmung der endogenen NO-Synthase resultierte ebenfalls in einer proteolytischen Spaltung in p17.

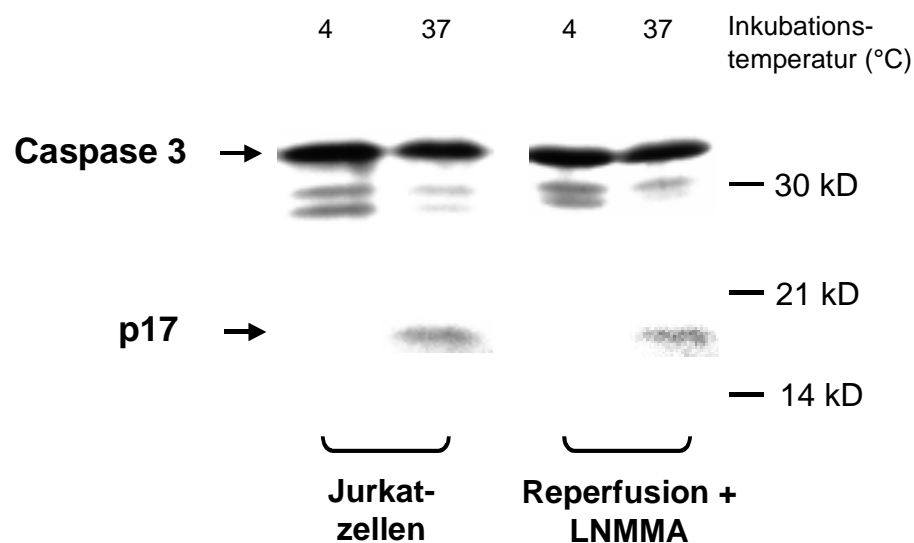


Abb. 29: Nachweis der endogenen Caspase-Spaltungsaktivität in Ischämie und Reperfusion. 80 µg anti-Fas stimulierter Jurkat-Extrakte bzw. 100 µg Proteinhomogenat aus Rattenherzen wurden mit [³⁵S]-markierter Caspase-3 koinkubiert. TCA-Fällung, 15% SDS-Polyacrylamidgel. Dargestellt ist ein typisches Autoradiogramm.

4.4 Untersuchung der Apoptose in der Hypoxie

Ischämie und Hypoxie sind durch eine Unterversorgung des Gewebes mit Sauerstoff gekennzeichnet. Die Hypoxie ist die Folge der erniedrigten Sauerstoffzufuhr während der Ischämie. Kurzzeitige Ischämie resultierte nur in einem leichten Anstieg der Apoptose (siehe Kapitel 4.3), wobei endogenes NO vor Apoptose zu schützen scheint. Um die Effekte der langfristigen Hypoxie auf die Apoptose zu untersuchen, wurden Ratten und Mäusen, die für 21 Tage unter kontrollierter hypoxischer Atmosphäre mit 10% Luftsauerstoff gehalten wurden, im Vergleich zu Tieren unter Normoxie (21% Luftsauerstoff) analysiert.

4.4.1 Apoptose in der Hypoxie im Rattenmodell

Um die Apoptose in der Hypoxie zu untersuchen, wurden die Herzen von männlichen Wistar-Furth-Ratten analysiert, die für 21 Tage bei freiem Zugang zu Wasser und Futter unter Hypoxie bzw. Normoxie gehalten wurden (n=4 pro Gruppe, alters- und gewichtsdefiniert).

4.4.1.1 Nachweis der Apoptose

Der Nachweis der Apoptose in DNA, die aus den Rattenherzen isoliert wurde, ergab, daß 21-tägige Hypoxie im Vergleich zu normoxischen Ratten zu einer verstärkten DNA-Fragmentierung führte. (Abb. 30).

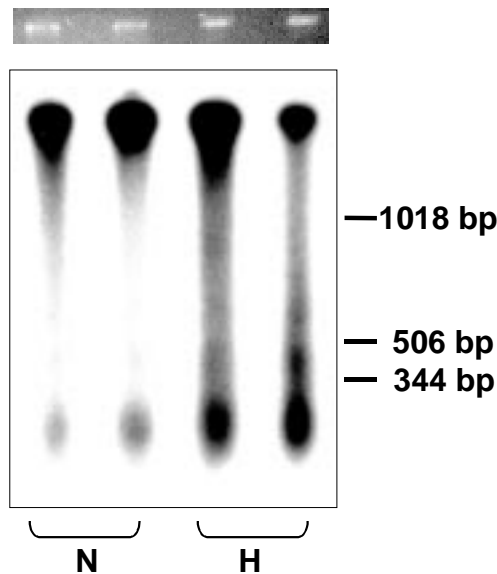


Abb. 30: Nachweis der DNA-Fragmentierung in der Hypoxie in Ratten. Gewichts- und altersdefinierten Wistar-Furth Ratten wurden für 21 Tage in kontrollierter Atmosphäre mit 10% (Hypoxie = H) bzw. 21% (Normoxie = N) Luftsauerstoff gehalten. Gesamt-DNA aus den Herzen wurde radioaktiv markiert und im Agarosegel aufgetrennt. Dargestellt sind Ethidiumbromid-Färbung (*oben*) sowie dazugehöriges Autoradiogramm (*unten*). bp = Basenpaare.

4.4.1.2 Regulation von Bax, Bcl-2 und p53

Um den Einfluß der Hypoxie auf Bcl-2 ähnliche Proteine und p53 in Rattenherzen zu untersuchen, wurden Western Blot-Analysen gegen Bax, Bcl-2 und p53 durchgeführt.

Bax Protein wurde durch Hypoxie auf $229 \pm 94\%$ (im Vgl. zu Normoxie, $n=4$ pro Gruppe) erhöht, während Bcl-2 Protein reduziert ($49 \pm 14\%$) wurde (Abb. 31). Das Verhältnis von Bcl-2 zu Bax veränderte sich dabei von 1:0,4 in der Normoxie auf 1:2,1 in der Hypoxie. Für p53 konnte ebenfalls eine Erhöhung durch Hypoxie gezeigt werden ($214 \pm 121\%$, Abb. 31), die aber aufgrund der großen Standardabweichung nicht signifikant war.

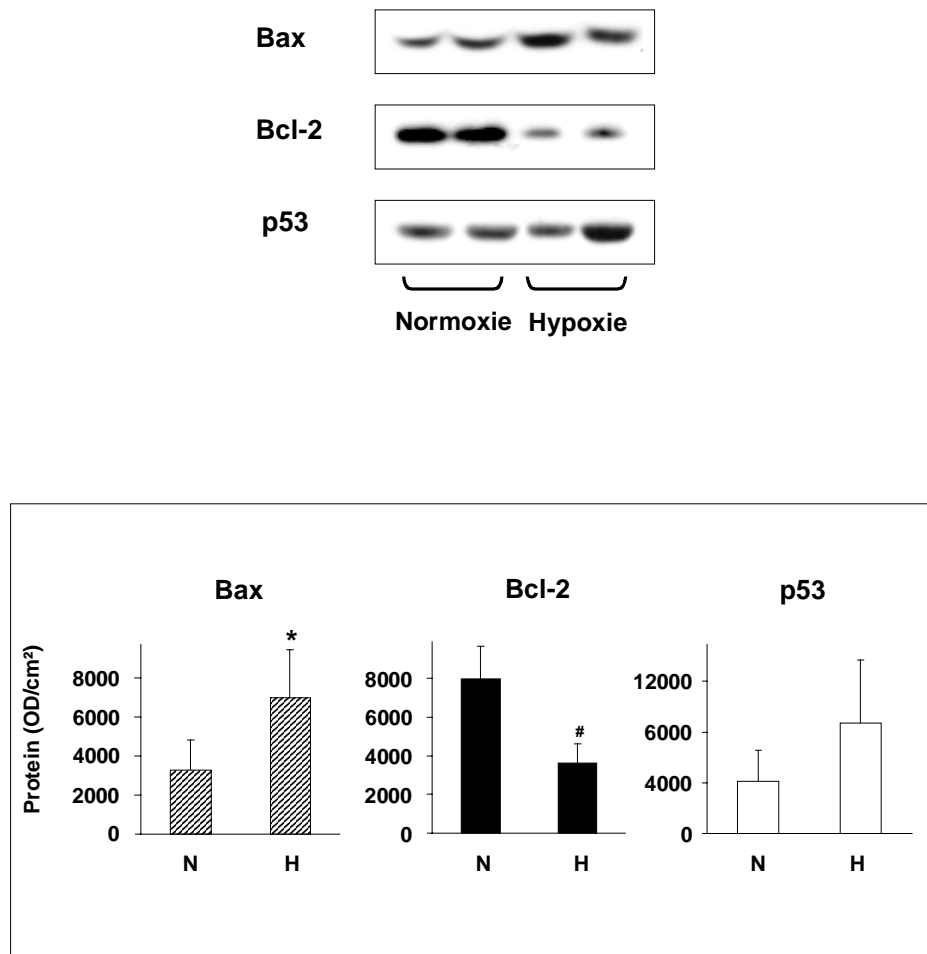


Abb. 31: Regulation von Bax, Bcl-2 und p53 Protein in hypoxischen Rattenherzen. (A.) 50 µg der Proteinhomogenate jeder Gruppe wurden im 12% SDS-Polyacrylamidgel (Bcl-2 und Bax) bzw. 9%-Gel (p53) aufgetrennt. (B.) Densitometrische Auswertung, n=4 je Gruppe, MW±SD. # p<0,05 zu Bcl-2 in Normoxie, * p<0,05 zu Bax in Normoxie.

4.4.2 Apoptose in der Hypoxie im Mausmodell

Der Einfluß endogenen NOs auf die Apoptose sollte auch in der langfristigen Hypoxie untersucht werden. Da keine Knockoutratten zur Verfügung stehen, wurden gewichts- und altersdefinierte männliche NO-Synthase-Knockoutmäuse in Normoxie und Hypoxie (21

Tage 21% bzw. 10% O₂) analysiert. Es wurden sowohl Mäuse verwendet, die eine Defizienz der induzierbare NOS (iNOS^{-/-}, n=3 pro Gruppe) aufwiesen, als auch Mäuse mit einem Knockout der endothelialen NOS (eNOS^{-/-}, n=2 pro Gruppe). Als Kontrolle dienten C57BL6-Mäuse (n=2 pro Gruppe).

4.4.2.1 Untersuchung der Apoptose in Wildtypmäusen

4.4.2.1.1 Nachweis der Apoptose in der Hypoxie in Wildtypmäusen

Zunächst wurden die Ergebnisse der Hypoxieversuche in Ratten (Punkt 4.4.1) im Mausmodell verifiziert. Auch in Herzen des Wildtypes, die für 21 Tage unter Hypoxie (10% Luftsauerstoff) gehalten wurden, erhielt man im Vergleich zu normoxischen Kontrollmäusen eine deutliche DNA-Fragmentierung (Abb. 32).

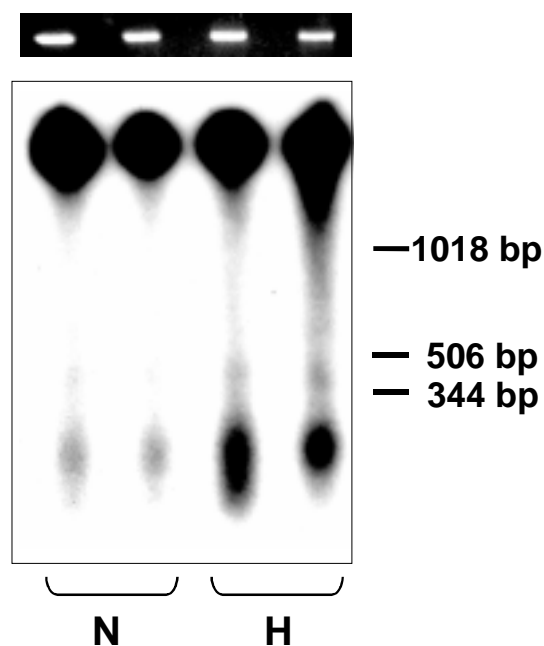


Abb. 32: Nachweis der DNA-Fragmentierung in der Hypoxie in Mäusen. Gewichts- und altersdefinierte C57BL6-Mäuse wurden für 21 Tage in kontrollierter Atmosphäre mit 10% (Hypoxie = H) bzw. 21% (Normoxie = N) Luftsauerstoff gehalten. Gesamt-DNA aus den Herzen wurde radioaktiv markiert und im Agarosegel aufgetrennt. Dargestellt ist die Ethidiumbromid-Färbung (*oben*) sowie das dazugehörige Autoradiogramm (*unten*). bp = Basenpaare.

4.4.2.1.2 Regulation von Bax und Bcl-2 in Wildtypmäusen

Western Blot Analysen von Bax Protein zeigten in Herzen von Mäusen einen Bax-Anstieg in der Hypoxie auf $366 \pm 82\%$ im Vergleich zur Normoxie (Abb. 33, $n=2$ pro Gruppe). Bei leicht erhöhtem Bcl-2-Protein in der Hypoxie ($176 \pm 34\%$, $n=2$, Abb. 33) verminderte sich damit das Verhältnis von Bcl-2 zu Bax.

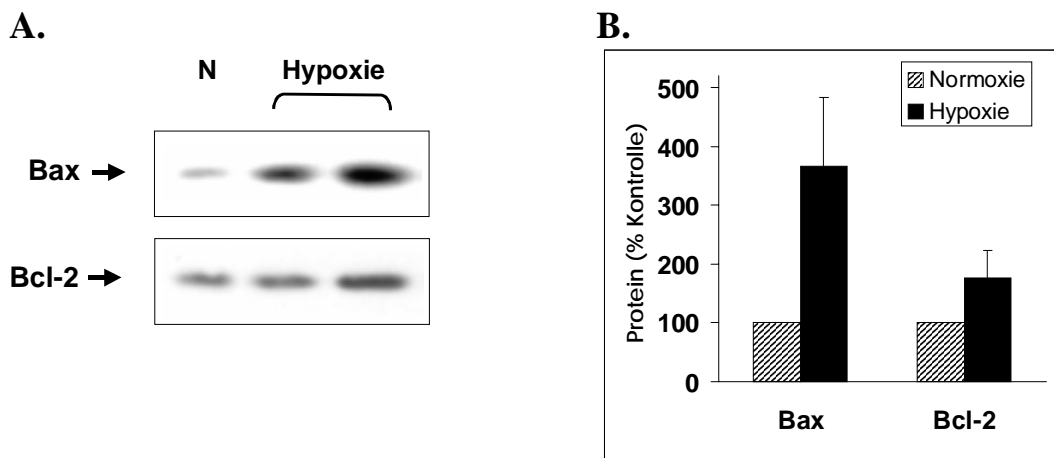


Abb. 33: Regulation von Bax und Bcl-2 Protein in Mäuseherzen. Western Blot-Analysen von Proteinen aus Herzen von C57BL6-Mäusen, die unter Normoxie (=N) oder Hypoxie gehalten wurden. (A.) 50 µg der Proteinhomogenate wurden im 12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. (B.) Densitometrisch Auswertung, $n=2$ je Gruppe, $MW \pm SD$.

4.4.2.2 Untersuchung der Apoptose in NO-Synthase-Knockout-Mäusen

Die Ergebnisse des Ischämie/Reperusionsmodells (Punkt 4.3) ließen protective Effekte von Stickstoffmonoxid auf Apoptoseinduktion vermuten. Um die Effekte unterschiedlicher NO-Konzentrationen zu ermitteln, wurde an männlichen NO-Synthase-Knockout-Mäusen (männlich, alters-/geschlechtsdefiniert) der Einfluß der induzierbaren NOS (iNOS, hohe NO-Produktion) und der endothelialen NOS (eNOS, niedrige NO-Produktion) auf die Apoptose in Normoxie (21% Luftsauerstoff) und Hypoxie (10% O₂) untersucht.

4.4.2.2.1 Nachweis der Apoptose in NOS-Knockout-Mäusen

Der eNOS-Knockout (eNOS^{-/-}, n=2) führte im Vergleich zu Kontrollmäusen unter normoxischen Bedingungen zu einer starken DNA-Fragmentierung (Abb. 34). Zusätzliche Hypoxie (n=2) bewirkte eine additive Verstärkung der Apoptose. Im iNOS-Knockout (iNOS^{-/-}, n=3) erhielt man keine deutliche DNA-Leiter, sondern vorwiegend höhermolekulare Fragmente. Hypoxie (n=3) führte in Herzen von iNOS-Knockoutmäusen zu einer DNA-Fragmentierung. In den abgebildeten Autoradiogrammen ist bei Kontrolltieren in der Hypoxie keine deutliche DNA-Fragmentierung zu erkennen, was durch die kurze Expositionszeit zu erklären ist. Diese wurde so gewählt, daß die Fragmentierung in den Knockout-Tieren zu erkennen ist.

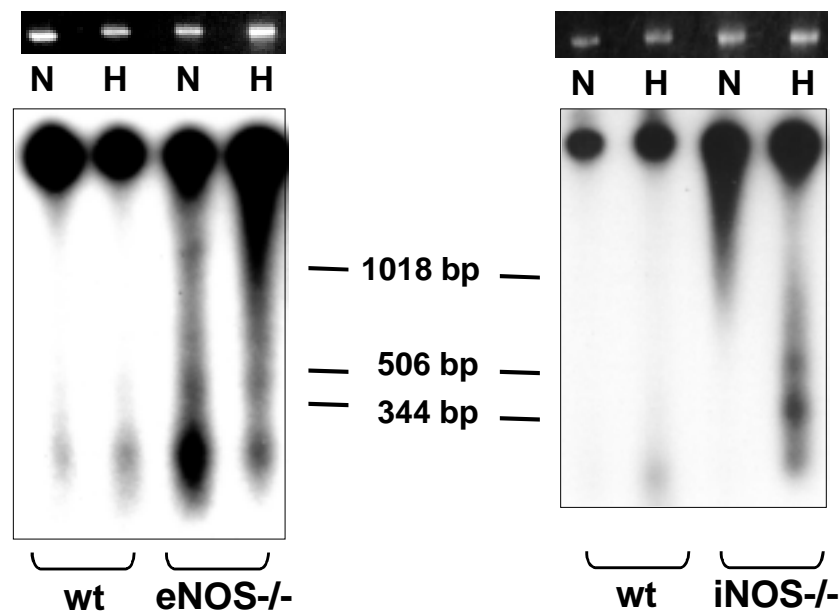


Abb. 34: Nachweis der DNA-Fragmentierung in NOS-Knockout-Mäusen durch radioaktive Markierung. Untersuchung der DNA aus Herzen von Kontrollmäusen (wt, C57BL6), eNOS-Knockout-Mäusen (eNOS^{-/-}) und iNOS-Knockout-Mäusen (iNOS^{-/-}), die für 21 Tage in kontrollierter Atmosphäre mit 21% (Normoxie = N) bzw. 10% (Hypoxie = H) Luftsauerstoff gehalten wurden. Dargestellt sind Ethidiumbromid-Färbungen und Autoradiogramme. bp = Basenpaare.

4.4.2.2 Regulation von Bax und Bcl-2 in NO-Synthase-Knockout-Mäusen

Der eNOS-Knockout führte zu einer Bax-Erhöhung ($247 \pm 29\%$ im Vgl. zu Kontrollmäusen unter Normoxie, Abb. 35). Zusätzliche Hypoxie resultierte in einer additiven Bax-Erhöhung auf $402 \pm 10\%$. Bcl-2-Protein wurde weder in Normoxie ($146 \pm 7\%$) noch in Hypoxie ($107 \pm 28\%$) reguliert. Im Gegensatz dazu führte iNOS-Knockout zu vermindertem Bax-Protein ($55 \pm 28\%$). Durch 21 Tage Hypoxie wurde Bax-Protein auf das Kontrollniveau erhöht ($104 \pm 9\%$). Auch der iNOS-Knockout bewirkte keine Veränderung des Bcl-2-Proteins in Normoxie ($197 \pm 33\%$) und Hypoxie ($137 \pm 10\%$).

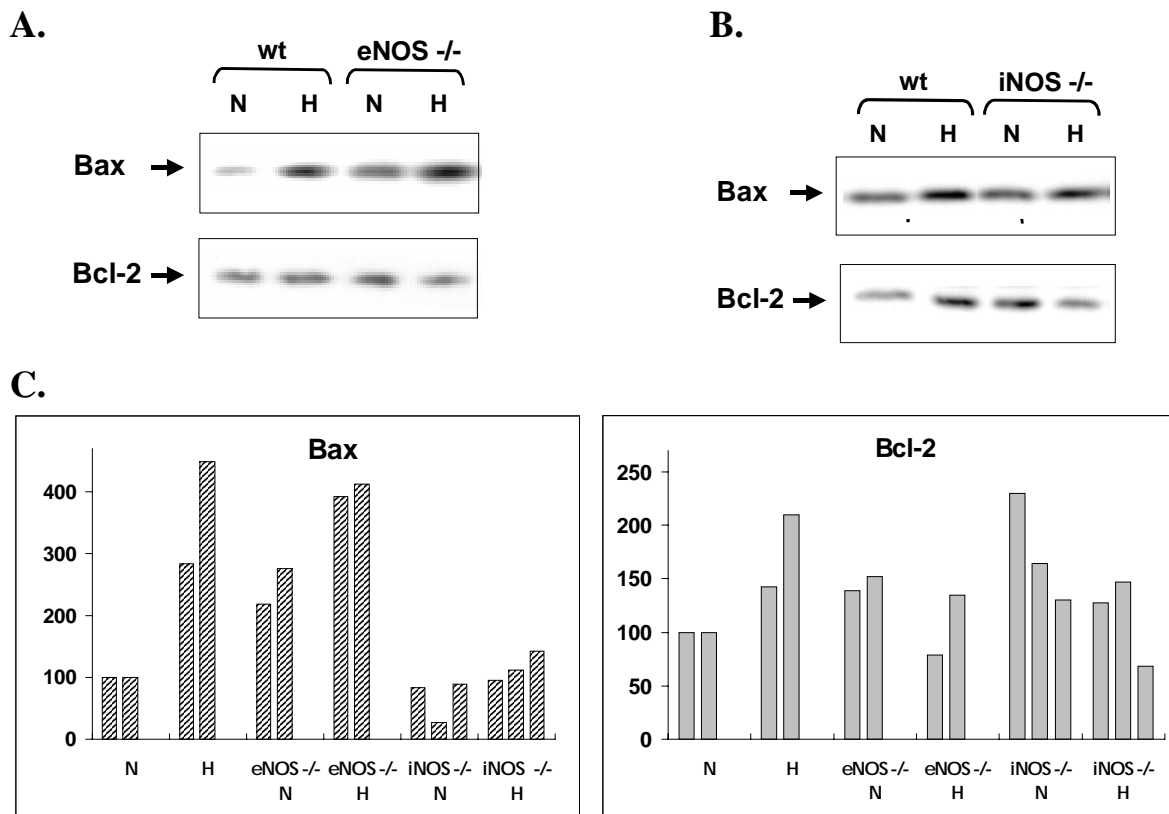


Abb. 35: Regulation von Bax und Bcl-2 Protein in NOS-Knockout-Mäusen in Normoxie (N) und Hypoxie (H). Proteinhomogenate aus Mausherzen (A) eNOS^{-/-}, (B) iNOS^{-/-} im Vergleich zu Kontrollen Normoxie (C57BL6-Mäuse). (C) Densitometrische Auswertung; aufgetragen sind die Werte der einzelnen Tiere.

4.4.2.3 Regulation der eNOS in NOS-Knockout-Mäusen

In Lungen von iNOS-Knockout-Mäusen wurde eine stärkere Induktion von eNOS durch Hypoxie beobachtet als in Wildmäusen, während die basale eNOS-Expression in der Normoxie jedoch in Wildmäusen höher war als im iNOS-Knockout (140).

Deshalb wurde eNOS Protein in Herzen der NOS-Knockoutmäuse untersucht (Abb. 36).

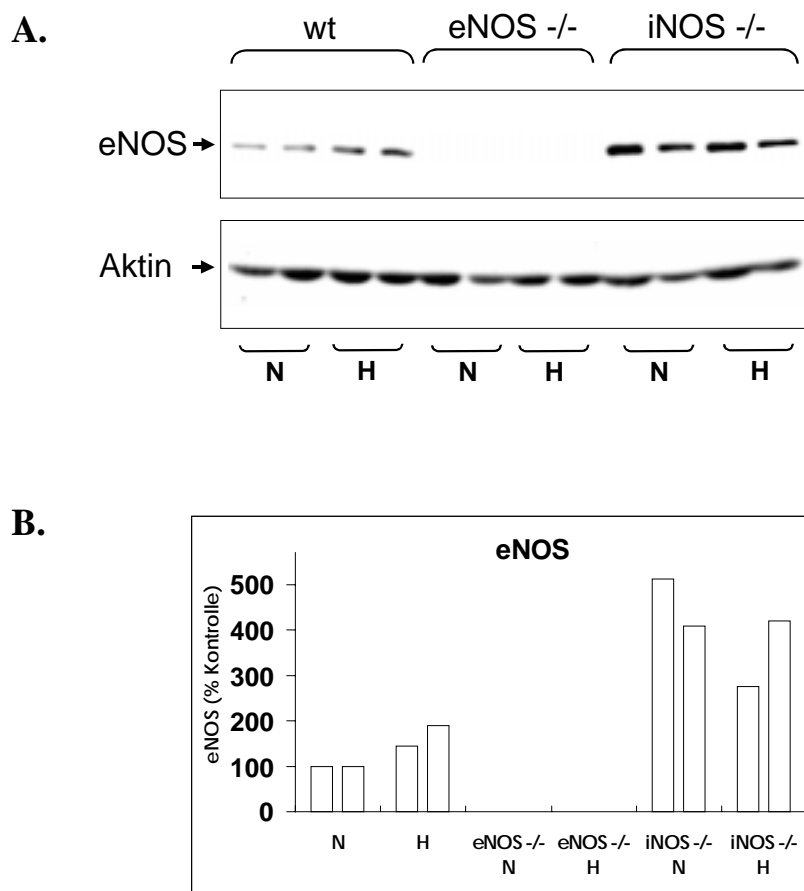


Abb. 36: Regulation von eNOS Protein in NOS-Knockout-Mäusen in Normoxie (N) und Hypoxie (H). (A.) 40 µg Proteinhomogenat wurden im 8%-SDS-Polyacrylamidgel, Western Blots gegen eNOS und Aktin. (B.) Densitometrische Auswertung: dargestellt sind die Werte der einzelnen Tiere. Als Kontrolle dienten Herzen von C57BL6-Mäusen unter Normoxie. wt = Wildtyp, eNOS -/- = eNOS-Knockout, iNOS -/- = iNOS-Knockout.

In Herzen von Wildtypmäusen wurde eNOS Protein durch Hypoxie leicht, aber nicht signifikant hochreguliert ($167 \pm 32\%$ im Vergleich zu wt Normoxie). iNOS-Knockout dagegen resultierte in einem 4-fachen Anstieg von eNOS in der Normoxie ($461 \pm 73\%$) im

Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unter Normoxie. Hypoxie regulierte auch im iNOS-Knockout nicht den eNOS-Proteingehalt ($348 \pm 102\%$). In eNOS-Knockout-Mäusen war weder in Normoxie noch in Hypoxie eNOS zu detektieren.

4.B IN VITRO-CHARAKTERISIERUNG DER TNF/CHX-INDUZIERTEN DEGRADATION DER ENDOTHELIALEN NO-SYNTASE (eNOS)

TNF- α ist ein wichtiges proinflammatorisches Enzym. Neben der Sezernierung durch Makrophagen hat auch die TNF- α -Synthese durch Kardiomyozyten eine entscheidende Bedeutung für die Entstehung myokardialer Dysfunktionen und Erkrankungen, wie der Ischämie und Reperfusion, dem Myokardinfarkt, bei Herzversagen und der Abstoßung von Herztransplantaten [116].

Neben den bekannten Effekten konnte gezeigt werden, daß TNF- α Apoptose in verschiedenen Zelltypen [116], u.a. in Endothelzellen [148], auslöst und die Halbwertszeit der eNOS-mRNA und damit die NO-Synthese reduziert [185]. In HUVEC konnte gezeigt werden, daß NO dosisabhängige Effekte auf die TNF- α induzierte Apoptose ausübt: niedrige Konzentrationen waren protektiv und antiapoptotisch, hohe Konzentrationen verstärkten die Apoptose und wirkten zytotoxisch. Nachdem die in dieser Arbeit vorgestellten in vivo-Versuche darauf hinwiesen, daß von der endotheliale NO-Synthase (eNOS) produziertes NO für protektive Effekte verantwortlich zu sein scheint, sollte der Einfluß von TNF- α auf die eNOS in Endothelzellen (HUVEC) untersucht werden. Um posttranslationale Effekte zu untersuchen, wurde die Proteinneusynthese mit Zykloheximid (CHX) gehemmt.

4.5.1 Einfluß von Proteasomenkomplex-Inhibitoren auf die eNOS-Degradation in HUVEC

Wurden 3×10^5 HUVEC mit 50 ng/ml TNF- α inkubiert, reduzierte sich die Menge an eNOS-Protein auf $50 \pm 19\%$ im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 37). Zusätzliche Hemmung der Proteinsynthese mit Zykloheximid (CHX, 20 $\mu\text{g/ml}$) verstärkte die eNOS-Reduktion auf $30 \pm 22\%$, während CHX alleine in einer leichten, jedoch nicht signifikanten Verringerung von eNOS-Protein auf $73 \pm 21\%$ resultierte.

Proteine werden in der Zelle hauptsächlich durch Degradation in Lysosomen oder durch den Ubiquitin-Proteasomenkomplex abgebaut. Pharmakologische Inhibition des Proteasomenkomplexes mit 20 μM ZLLLH oder 25 μM Lactacystin hemmten die durch TNF/CHX-induzierte eNOS-Degradation auf $81\pm 15\%$ bzw. $81\pm 13\%$ (Abb. 37), während weder ZLLLH noch Lactacystin die durch TNF- α alleine induzierte eNOS-Degradation hemmen konnten, sondern diese noch verstärkten ($20\pm 7\%$ bzw. $29\pm 1\%$).

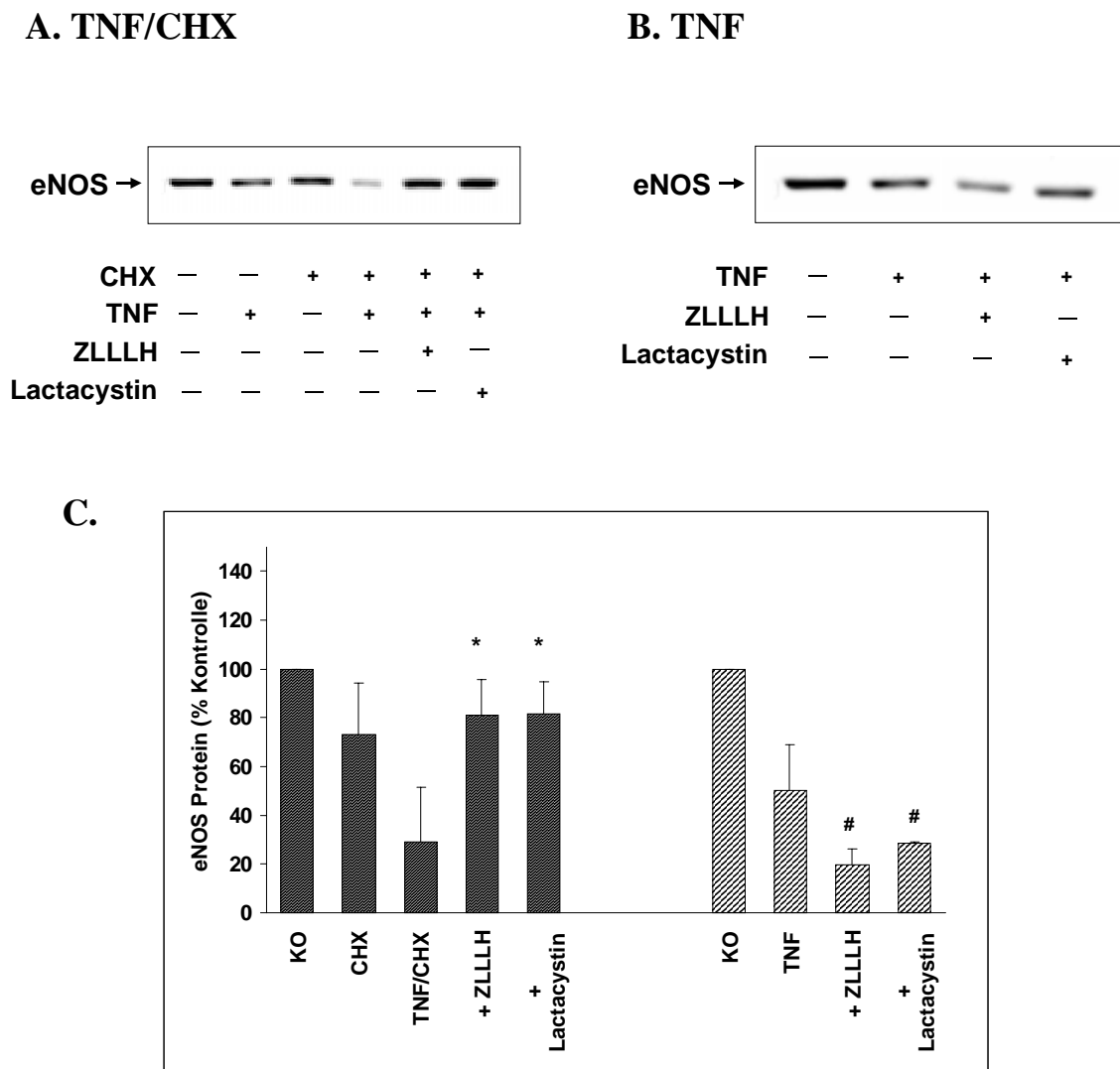


Abb. 37: Hemmung der durch TNF/CHX induzierten eNOS-Degradation in HUVEC durch Inhibitoren des Proteasomenkomplexes. Nach 30 minütiger Vorinkubation von 3×10^5 HUVEC mit 20 μM ZLLLH und 25 μM Lactacystin, wurde für 12 Stunden mit 50 ng/ml TNF \pm 20 $\mu\text{g/ml}$ CHX (A.) bzw. nur mit TNF (B.) koinkubiert. Exemplarische Western Blots gegen eNOS (140 kD Größe). (C.) Densitometrische Auswertung, $n=3$, * $p<0,05$ zu TNF/CHX, # $p<0,05$ zu TNF.

4.5.2 Einfluß von Proteasomenkomplex-Inhibitoren auf die eNOS-Degradation *in vitro*

Zur Charakterisierung dieses Mechanismus wurde ein *in vitro*-Assay aufgebaut, um die proteolytische Aktivität vorstimulierter HUVEC-Extrakte (2 h TNF/CHX) zu untersuchen (siehe Material & Methoden). Um nachzuweisen, daß proteolytische Aktivität nur durch Vorinkubation mit TNF/CHX induziert wurde, wurden zusätzlich Extrakte aus unbehandelten Zellen gewonnen. Die Inkubation von Kontrolleextrakten bei 37°C führte in der Gegenwart von CaCl₂ zu einer Degradation der eNOS (19±3%), während in Abwesenheit von CaCl₂ eine wesentlich geringere Degradation (85±30%) der eNOS durch Kontrolleextrakte zu beobachten war (Abb. 38). Deshalb wurden die weiteren Versuche ohne Zugabe exogenen CaCl₂ durchgeführt.

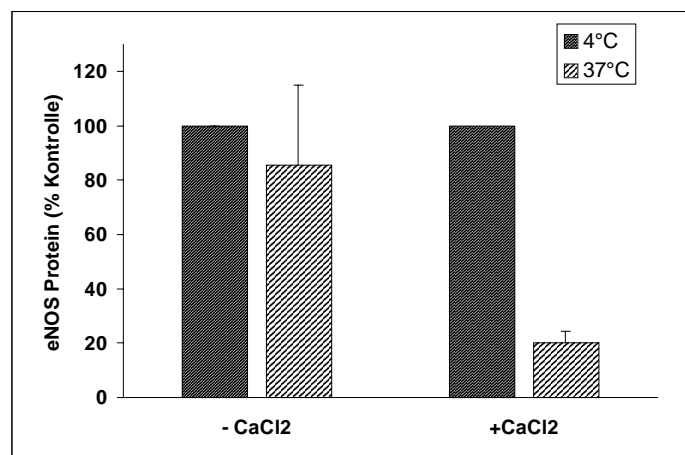


Abb. 38: eNOS-Degradation in Kontrolleextrakten. 50 µg unbehandelte Kontrolleextrakte wurden 3 h bei 4°C oder 37°C in Gegenwart und in Anwesenheit von 10 mM CaCl₂ inkubiert. 8% SDS-Polyacrylamidgel. Dargestellt sind Quantifizierungen der Western Blots gegen eNOS (n=3).

Die Inkubation von mit TNF/CHX vorstimulierten Extrakten bei 37°C resultierte in einer Degradation der eNOS auf 39±13% (Abb. 39), die durch Zugabe von 40 µM ZLLLH oder 50 µM Lactacystin gehemmt werden konnte (114±26% bzw. 90±17%). Dagegen konnte die eNOS-Degradation in TNF vorstimulierten Extrakten (49±25%) nicht völlig durch ZLLLH und Lactacystin inhibiert werden (77±28% bzw. 61±22%).

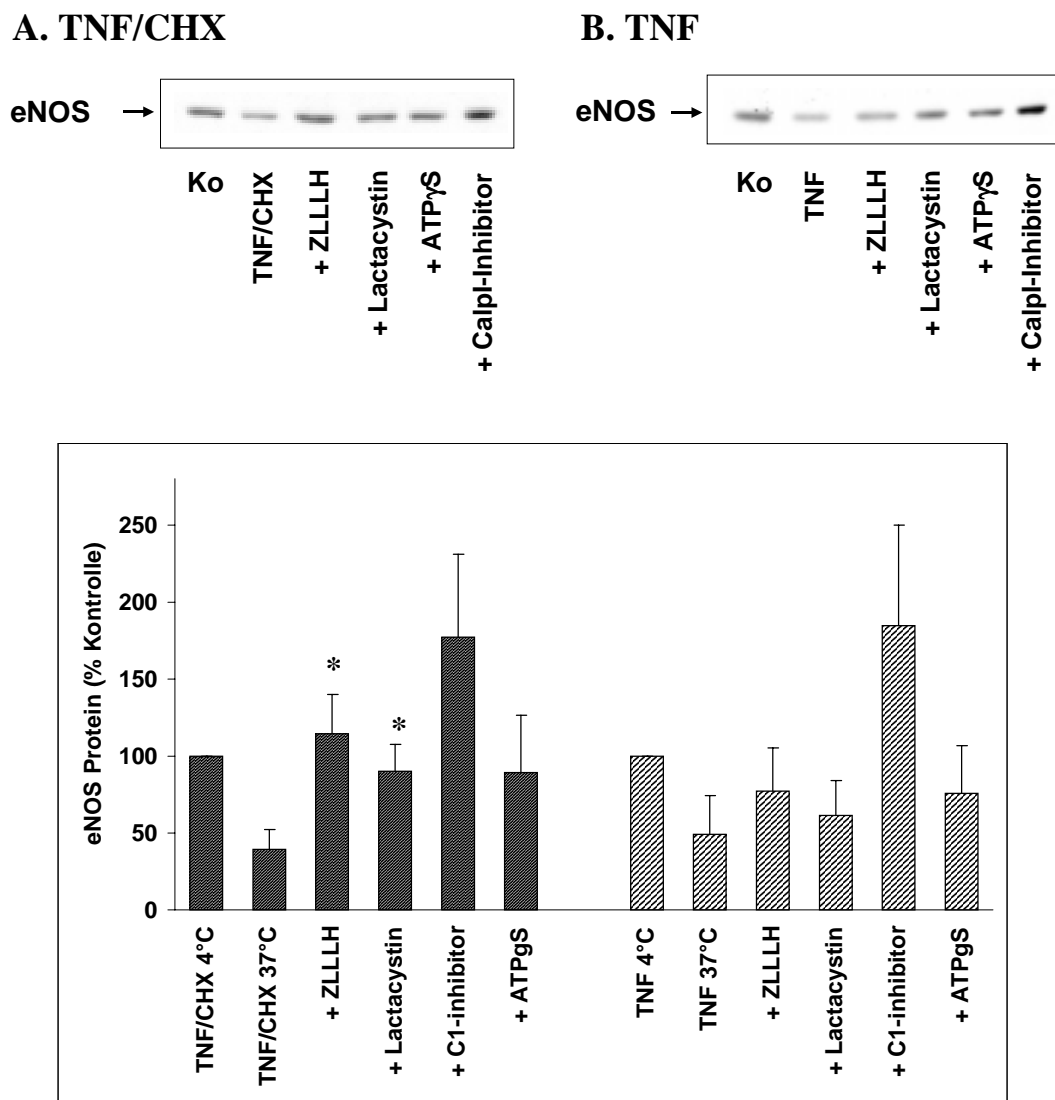


Abb. 39: Hemmung der durch TNF/CHX induzierten eNOS-Degradation in HUVEC durch Inhibitoren des Proteasomenkomplexes. 50 μ g der vorbehandelten Zellextrakte (A.) 2 h 50 ng/ml TNF + 20 μ g/ml CHX, (B.) 3 h 50 ng/ml TNF bzw. wurden 3 h bei 4°C oder 37°C mit den Inhibitoren kokubiert. Als Kontrolle wurden 50 μ g der Extrakte bei 4°C inkubiert. 40 μ M ZLLLH, 50 μ M Lactacystin, 5 mg/ml CalpainI-Inhibitor und 2 mM ATP γ S. (C.) Densitometrische Auswertungen, n=3, * p<0,05 zu TNF/CHX 37°C.

Da die Aktivität des Proteasomenkomplexes ATP-abhängig ist, wurde der Einfluß des kompetitiven Inhibitors ATP-abhängiger Prozesse ATP γ S auf die eNOS-Degradation untersucht. Wie in Abb. 39 dargestellt, konnte ATP γ S die TNF/CHX-induzierte Degradation inhibieren (90 \pm 37%), während die TNF-induzierte Degradation unbeeinflußt blieb (76 \pm 32%).

4.5.3 Einfluß der TNF/CHX-induzierten eNOS-Degradation auf die eNOS-Aktivität

Um die eNOS-Aktivität zu ermitteln, wurde die indirekte Messung der cGMP-Akkumulation verwendet, da Stickstoffmonoxid die cGMP-Bildung über Aktivierung der Guanylatzyklase induziert. 3×10^5 HUVEC wurden nach dem folgenden Versuchsschema inkubiert (siehe Abb. 40):

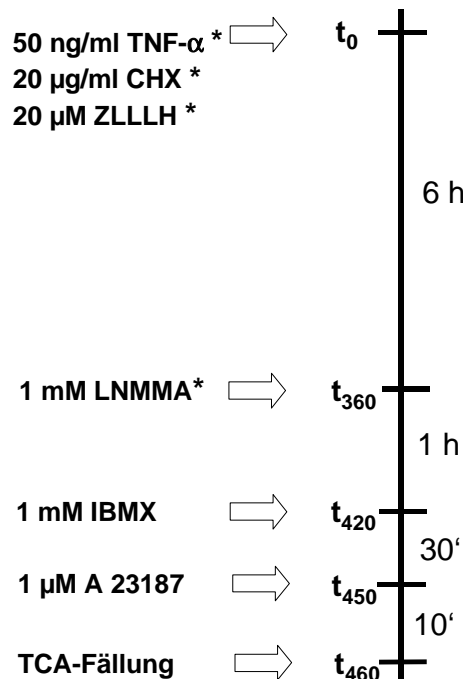


Abb. 40: Versuchsschema zur Ermittlung der cGMP-Akkumulation zur indirekten Messung der NO-Synthaseaktivität. 3×10^5 HUVEC wurden nach dem dargestellten Versuchsschema inkubiert. Nach Versuchsende wurden die Zellen durch eine TCA-Fällung zur Messung der cGMP-Akkumulation aufgearbeitet (siehe Material & Methoden). * = diese Substanzen wurden je nach Versuchsansatz zugesetzt, alle anderen Substanzen wurden immer zugesetzt.

Die indirekte Messung der eNOS-Aktivität zeigte, daß die Reduktion der cGMP-Menge in TNF/CHX stimulierten Zellen ($46 \pm 6\%$) durch Hemmung des Proteasomenkomplexes mit 20 µM ZLLLH inhibiert wurde ($79 \pm 21\%$, Abb. 41). Dagegen ließ sich die in TNF-α vorbehandelten Zellen auf $72 \pm 13\%$ reduzierte cGMP-Akkumulation nicht durch ZLLLH aufheben ($77 \pm 17\%$).

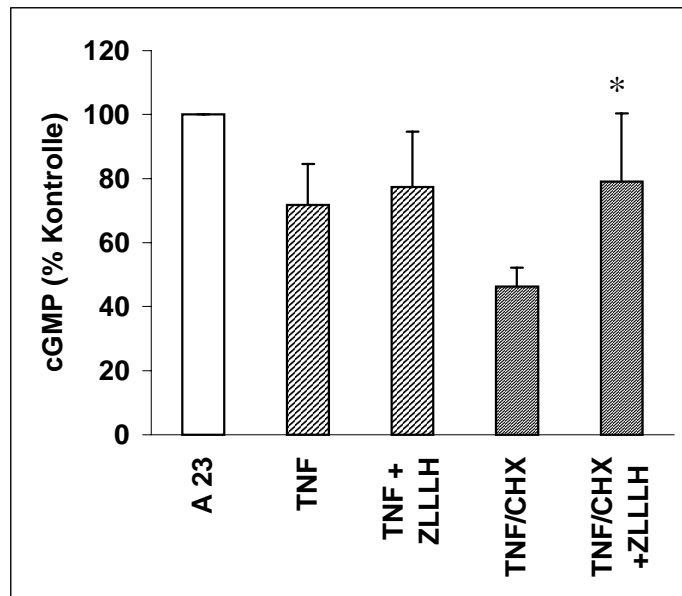


Abb. 41: Effekte von TNF/CHX auf die eNOS-Aktivität. 3×10^5 HUVEC wurden für 7 Stunden mit 50 ng/ml TNF \pm 20 μ g/ml CHX inkubiert. Dann wurde für 1h mit 1 mM IBMX und für weitere 10 Minuten mit Calcium-Ionophore A23187 koinkubiert. Anschließend wurden die cGMP-Menge im ELISA (Amersham, Braunschweig) ermittelt. 20 μ M ZLLLH, 25 μ M Lactacystin, 1 mM LNMMA. n=3, * $p < 0,05$ zu TNF/CHX.

4.5.4 Bedeutung von interagierenden Proteinen auf die eNOS-Proteolyse

Koinkubation von TNF- α behandelten HUVEC mit dem Proteinsyntheseinhibitor CHX resultierte in einer spezifischen Degradation der eNOS ohne eine transkriptionelle Veränderung der Proteinestabilität. Deshalb sollte die Frage untersucht werden, ob ein assoziiertes Protein beteiligt ist.

Die Interaktion der eNOS mit anderen Proteinen stellt neben der transkriptionellen und der Proteinregulation eine Möglichkeit dar, um die eNOS-Aktivität zu modulieren. Nachdem für die neuronale NOS (nNOS) Interaktionspartner beschrieben wurden, konnten auch interagierende Proteine der eNOS nachgewiesen werden.

4.5.4.1 Einfluß von TNF/CHX auf Heat-Shock-Proteine

Die Heat-Shock-Proteine sind durch ihre Funktion als Chaperone wesentlich am Transport und Schutz von Proteinen beteiligt. Kürzlich wurde das Heat Shock Protein HSP 90 als Interaktionspartner der eNOS identifiziert, wobei die Interaktion von HSP 90 und eNOS zu einer erhöhten Aktivität der eNOS führte [50]. Deshalb wurde zunächst der Einfluß von TNF/CHX auf HSP 90-Protein untersucht.

Wie in Abb. 42 dargestellt, wurde HSP 90 Protein durch Inkubation mit TNF/CHX zeitabhängig degradiert (1h: $67\pm 7\%$, 3h: $53\pm 22\%$, 6h: $55\pm 17\%$, 12h $30\pm 3\%$). Durch die Inkubation mit CHX wurde die HSP 90 Proteinmenge im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen reduziert, über die Zeit aber nicht signifikant reguliert (3h: $81\pm 7\%$, 6h: $75\pm 7\%$, 12h: $72\pm 15\%$).

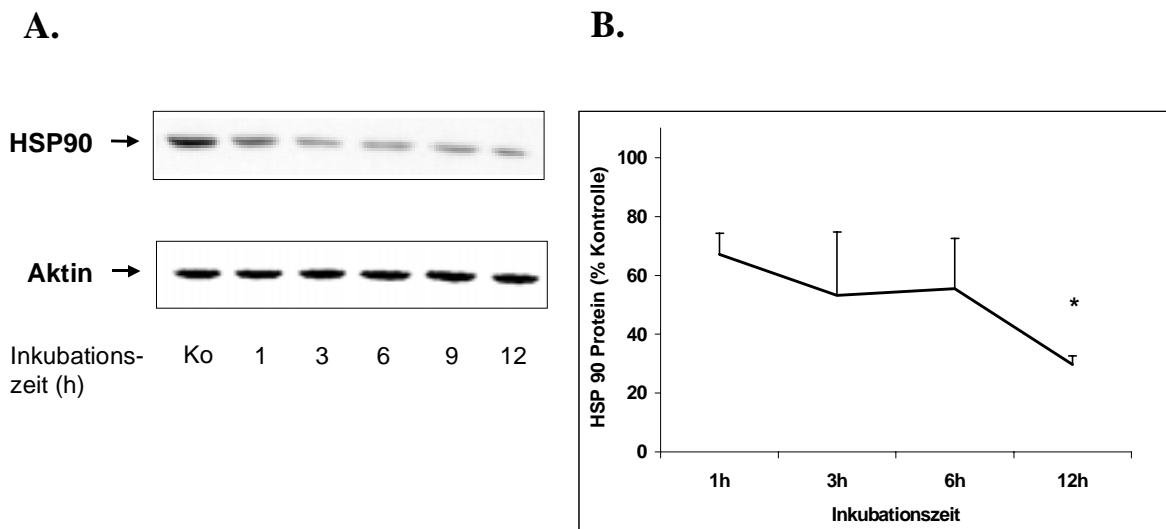


Abb. 42: Zeitabhängiger Einfluß von TNF/CHX auf HSP90 in HUVEC. 3×10^5 HUVEC wurden für die genannten Zeitpunkte mit 50 ng/ml TNF und 20 μ g/ml CHX inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. (A.) 8% SDS-Polyacrylamidgel. Western Blot gegen HSP 90 und Aktin. (B.) Densitometrische Auswertung der Western Blots (n=3). * $p < 0,05$ zu 1h.

Für HSP 70 wurden protektive Effekte auf durch Sauerstoffradikale induzierte Zellschädigungen [11, 136] sowie kardioprotektive Wirkung in der Ischämie [141] beschrieben. Deshalb sollte der Einfluß von TNF/CHX auf HSP 70 als möglichem Interaktionspartner der eNOS untersucht werden.

Wie in Abb. 43 dargestellt, hatten 50 ng/ml TNF und 20 µg/ml CHX keinen zeitabhängigen Einfluß auf HSP70 Protein (1h: 77%, 3h: 92%, 6h: 98%, 9h: 112%, 12h: 90%).

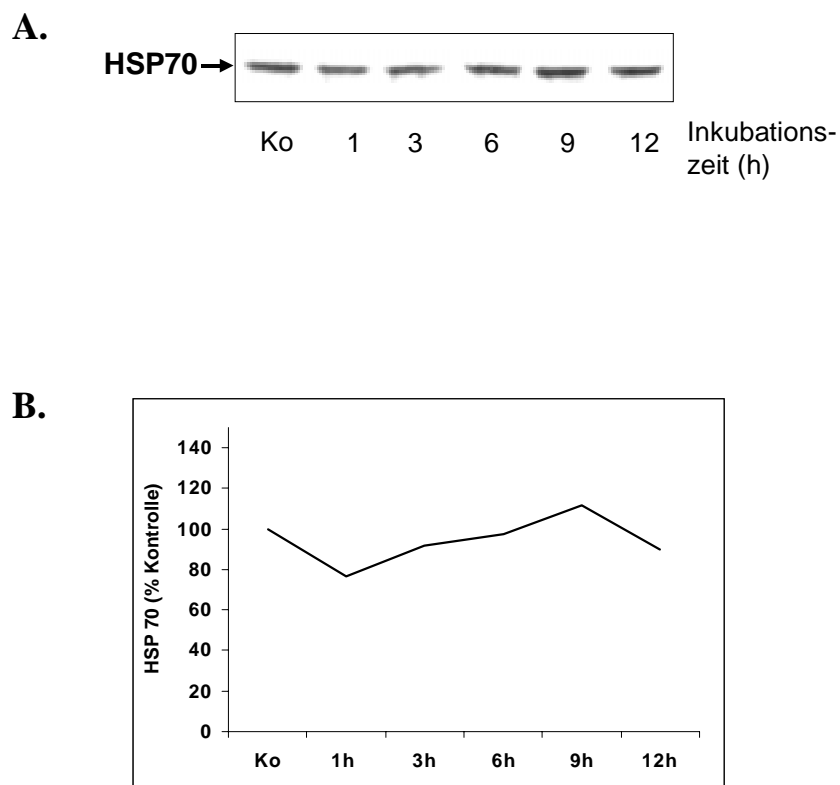


Abb. 43: Zeitabhängiger Einfluß von TNF/CHX auf HSP70 in HUVEC. 3×10^5 HUVEC wurden für die genannten Zeitpunkte mit 50 ng/ml TNF und 20 µg/ml CHX inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. (A.) 60 µg Protein wurden im 8% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, Western Blot gegen HSP70. (B.) Densitometrische Auswertung.

4.5.4.2 Einfluß von TNF/CHX auf Caveolin-1

Es konnte gezeigt werden, daß die eNOS-Aktivität durch Interaktion von eNOS mit Caveolin-1 vermindert wird [118]. Da bekannt war, daß die Schubspannung Caveolin-1 Protein zeitabhängig reguliert [26], wurde als Positivkontrolle eine Zeitkinetik für die Schubspannung untersucht. So regulierte die Schubspannung Caveolin-1 zeitabhängig mit Minimalwerten nach 3 h (57% im Vgl. zur Kontrolle) bzw. 6 h (50%) Inkubationszeit (Abb. 44). Die Inkubation von HUVEC mit 50 ng/ml TNF und 20 µg/ml CHX zeigte keinen signifikanten zeitabhängigen Effekt auf Caveolin-1 Protein zu allen untersuchten Zeitpunkten (1h: 83±4%, 3h: 128±29%, 6h: 105±7%, 12h 95±2%, 18h: 158± 85%, Abb. 44).

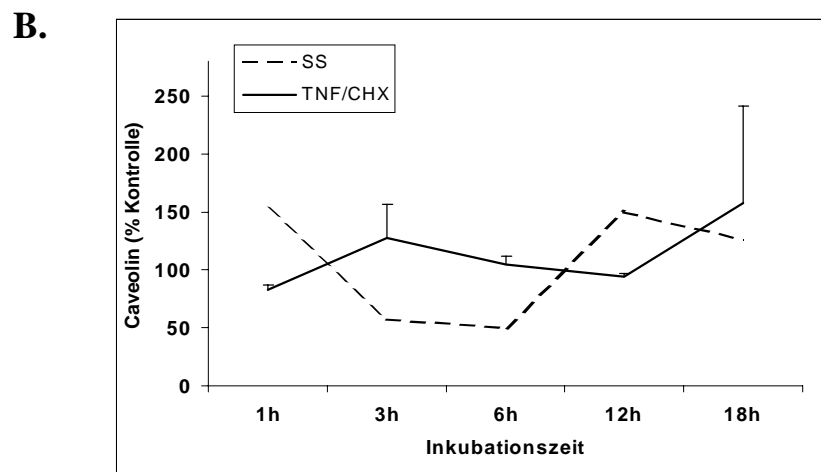
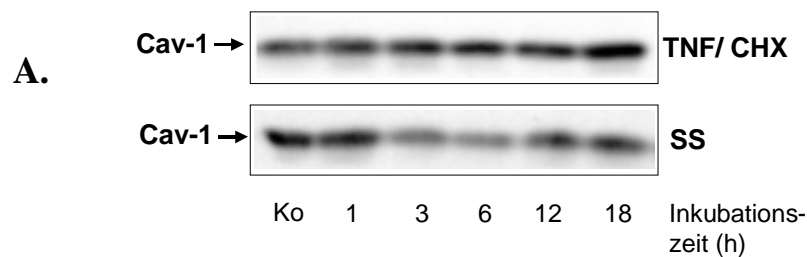


Abb. 44: Zeitabhängiger Einfluß von TNF/CHX und Shear Streß auf Caveolin-1 in HUVEC. 3×10^5 HUVEC wurden für die genannten Zeitpunkte mit 50 ng/ml TNF + 20 µg/ml CHX inkubiert oder laminarer Schubspannung (= SS, 15 dyn/cm²) ausgesetzt. (A.) 12% SDS-Polyacrylamidgel, (B.) Densitometrische Auswertung.

5 DISKUSSION

5.1 Apoptose in kardialen Erkrankungen

5.1.1 Apoptose in der Hyperlipidämie

In der vorliegende Arbeit konnte gezeigt werden, daß sich durch genetisch induzierte Hyperlipidämie (FFH-Kaninchen) fortgeschrittene atherosklerotische Plaques entwickeln, in denen typische DNA-Leitern sowie 1% TUNEL-positive vaskuläre glatte Muskelzellen und Makrophagen nachweisbar waren. Andere Studien bestätigen diese Ergebnisse mit variierenden Anteilen TUNEL-positiver glatter Muskelzellen und Makrophagen (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Apoptose in fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques (Typ V-VI-Läsionen). Angabe der TUNEL-positiver Zellen (in %) und Zelltypen in Plaques. Literaturvergleich.

Studie	% TUNEL+-Zellen	apoptotische Zelltypen
<u>Tiermodelle</u>		
vorliegende Arbeit, genetisch induzierte Hyperlipidämie	1%	MΦ, VSMC, (EC)
Kockx, 1998 [90]	< 2	MΦ, VSMC
Harada, 1997 [63]	0,5	MΦ, VSMC
<u>humane Atheroektonomien</u>		
Isner, 1995 [74]	< 2	VSMC, MΦ
Geng, 1995 [52]	34	VSMC, MΦ
Hegy, 1996 [68]	0,5	MΦ
Mallat, 1997 [108]	5-62	MΦ, T-L., (VSMC)
Bauriedel, 1998 [10]	13	VSMC, MΦ
Björkerud, 1996 [20]	1-18 *	MΦ, T-L., (VSMC)
Han, 1995 [61]	10-40 *	VSMC, MΦ

* = %-Zahl auf Plaqueregion bezogen, nicht auf Gesamtzellzahl. () = geringerer Anteil, VSMC = vaskuläre glatte Muskelzellen, MΦ = Makrophagen, EC = Endothelzellen, T-L. = T-Lymphozyten.

Wurde eine unspezifische Markierung durch modifizierte Färbetechniken vermieden, waren meist <2% TUNEL-positive Zellen zu detektieren. In Studien, die einen hohe Gehalt TUNEL-positiver Zellen erhielten, zeigten auch Gefäßregionen mit normaler Morphologie eine deutlich höhere Rate apoptotischer Zellen. Der Vergleich der verschiedenen Studien wird zudem dadurch erschwert, daß uneinheitliche Bezugsgrößen für die Berechnung der prozentualen Anteile TUNEL-positiver Zellen gewählt wurden (Gesamtzellzahl oder Plaqueregion).

Cholesterin-gefütterte Kaninchen (=H-Kaninchen) in der vorliegenden Arbeit dagegen zeigten keine morphologischen Veränderungen und keine detektierbare Apoptose. Die unterschiedlichen Ergebnisse der zwei verwendeten Hyperlipidämie-Modelle weisen auf eine Abhängigkeit der Apoptose vom Plaquestadium hin, was durch verschiedene andere Studien bestätigt wird (siehe Abb. 45).


Läsionentyp	Cai, 1997 (27)	Kockx, 1998 (88)	Harada, 1997 (63)	Crisby, 1997 (33)
Intimale Verdickung		—	—	
Fettstreifen		—	+	
Fibro- Atherom		+	+	
Plaqueruptur				+

Abb. 45: Abhängigkeit der Apoptose vom Plaquestadium. Vergleich von Literaturdaten.

Die mit zunehmendem Stadium veränderte Plaquezusammensetzung resultiert in einer Reduktion vaskulärer glatter Muskelzellen und einer Erhöhung von Makrophagen. Apoptotische VSMCs in Typ V-Läsionen befanden sich meist im fibrösen Anteil des Atheroms. Erhöhte Mengen von Makrophagen (MΦ) waren neben oder im lipidreichen Kern des Plaques zu finden [52]. Die Bedeutung der Apoptose von Makrophagen ist nicht klar, da zwar vermehrt apoptotische MΦ gefunden wurden, aber auch die Gesamtzahl der MΦ zunahm. Nach einer Plaqueruptur konnte Apoptose hauptsächlich in der fibrösen Kappe, an der Rupturstelle, nahe Fetteinlagerungen und um den nekrotischen Kern lokalisiert werden [33].

Hyperlipidämie gilt als klassischer Risikofaktor für die Atheroskleroseentstehung. Die Unterschiede in Apoptose in FFH- und H-Kaninchen der vorliegenden Untersuchung korrelieren nicht mit dem Gesamtcholesteringehalt im Serum. Dagegen scheint ein Zusammenhang zwischen Apoptose und LDL zu bestehen, denn der LDL-Anteil am Gesamtcholesterin stieg in FFH-Tieren auf das 4-fache im Vgl. zu Kontrolltieren, während er in gefütterten Tieren nur verdoppelt wurde. Dieser Befund wird durch Untersuchungen

humaner atherosklerotischer Plaques unterstützt, die eine Kolo-kalisation von TUNEL-positiven Zellen mit oxLDL-positiven Zellen nachwies [78]. Zudem löste oxLDL in verschiedenen Zelltypen Apoptose aus [19, 37, 43, 145] und induzierte eine Ceramidakkumulation [64, 85], die Caspase-Aktivierung [37, 64] und eine erhöhte p53-Expression [85]. Die entscheidende Bedeutung der Hyperlipidämie an der Plaquezusammensetzung wurde kürzlich von Kockx et al. [90] in Kaninchen gezeigt. So resultierte Cholesterinentzug in einer Erhöhung des Verhältnisses von glatten Muskelzellen zu Makrophagen, der kompletten Hemmung der Apoptose sowie der starken Reduktion von Zellproliferationen in durch Hyperlipidämie induzierten atherosklerotischen Plaques.

Die Apoptoseinduktion in fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques der in der vorliegenden Arbeit untersuchten FFH-Kaninchen korrelierte mit drastisch erhöhter Bax-Expression sowohl in Makrophagen als auch in VSMCs, was kürzlich auch für fortgeschrittene Plaques Cholesterin-gefütterter Kaninchen [90] und humaner Athero-ektomien [88, 91] gezeigt werden konnte. Im Gegensatz dazu fand man in Aorten aus H-Tiere eine geringere, aber dennoch verdoppelte Bax-Expression, die hauptsächlich in Endothelzellen lokalisiert war. Der mangelnde Apoptosenachweis kann dadurch erklärt werden, daß Bax-Expression und Detektion TUNEL-positiver Zellen in unterschiedlichen, aufeinanderfolgenden Zeitfenstern stattfinden. Kocks et al. [88] fanden in humanen Läsionen erst ab TypIII Bax-Immunreaktivität in glatten Muskelzellen und Makrophagen, während in intimalen Verdickungen keine Bax-Expression zu detektieren war. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, daß Bcl-2-Protein in atherosklerotischen Plaques nicht reguliert wurde. Im Gegensatz dazu konnten Cai et al. [27] in Plaques aus Atheroektomien Bcl-2-Immunreaktivität in Fas-negativen Zellen zeigen, während in Fas-positiven Zellen keine Bcl-2-Immunreaktivität zu beobachten war, was eine regulatorische Beteiligung von Bcl-2 in der Fas-vermittelten VSMC- und Makrophagenapoptose in fortgeschrittenen Plaques vermuten läßt. In anderen Untersuchungen konnte gar keine Bcl-2-Immunreaktivität detektiert werden [12, 88, 90, 91]. Kürzlich publizierte Ergebnisse lassen auch auf die Bedeutung anderer antiapoptotischer Bcl-2 Familienmitglieder, wie Bcl-x_L [138], schließen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß die erhöhte Bax-Expression in Endothelzellen ein frühes Ereignis in der Pathogenese der Atherosklerose - noch vor der intimalen Verdickung - darzustellen scheint. Zusammen mit den Befunden, daß

Apoptoseinduktion in fortgeschrittene Läsionen mit drastisch erhöhter Baxexpression in VSMC- und Makrophagen-Schaumzellen einhergeht, wird das kürzlich vorgeschlagenen Modell von Kockx [89] bestätigt. Danach kann die Progression atherosklerotischer Läsionen in eine "Programmierungsphase" (*commitment phase*) und eine "Exekutionsphase" (*execution phase*) eingeteilt werden. Die frühen Läsionen-Stadien der Programmierungsphase sind dabei gekennzeichnet von der erhöhten Expression verschiedener, für die Apoptose-Induktion wichtiger Proteine (wie Bax oder Fas). Durch zusätzliche Stimuli wird dann der Übergang in die Exekutionsphase und Apoptose induziert, in der unter anderem Caspasen-3 detektiert werden kann, die mit TUNEL-positiven Zellen kolokalisiert ist [108].

Die Bedeutung der Apoptose in der Pathogenese der Atherosklerose bleibt noch zu klären (siehe Abb. 46).

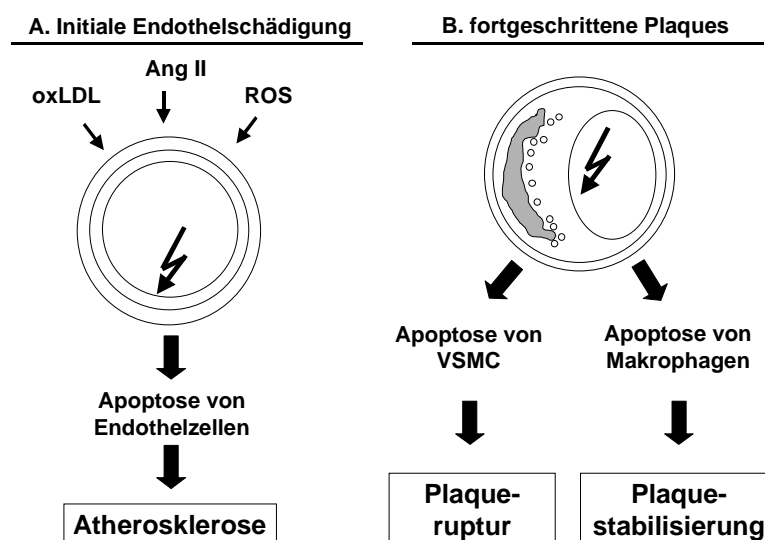


Abb. 46: Bedeutung der Apoptose in der Atheroskleroseentwicklung. oxLDL = oxidiertes Low density Lipoprotein, AngII = Angiotensin II, ROS = Reaktive Sauerstoffspezies, VSMC = vaskuläre glatte Muskelzellen.

Endothelschädigungen durch Apoptose könnten ein initiales Ereignis darstellen (Abb. 46a). Diese Hypothese wird dadurch unterstrichen, daß proatherosklerotische Faktoren wie oxLDL, Angiotensin II oder reaktive Sauerstoffspezies Apoptose in der Endothelzellkultur induzierten [37, 35, 69].

Die Apoptose in fortgeschrittenen Plaques stellt eine zweigeteilte Problematik dar (s. Abb. 46b): zum einen scheint die Apoptose von vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) in der

Neointima durch eine verminderte Kollagensynthese zu Plaqueruptur und Myokardinfarkt zu führen, während zum anderen die Apoptose von infiltrierenden Makrophagen-Schaumzellen zur Plaquestabilisierung zu führen scheint. Eine Hemmung der Apoptose könnte somit ein therapeutisches Ziel in der Behandlung atherosklerotischer Plaques darstellen, während präventive Behandlungen eher auf die Hemmung von Endothel-Apoptose, z.B. durch Antioxidantien wie Vitamin C und E, zielen könnte.

5.1.2 Apoptose in der akuten Abstoßung

In der vorliegenden Arbeit konnte Apoptose in akut abgestoßenen allogenen Herztransplantaten durch TUNEL-Färbung und Darstellung der typischen DNA-Leiter nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse werden durch andere Studien bestätigt, die sowohl in tierexperimentellen Studien [17, 79, 167] als auch in humanen Biopsien [168] Apoptose in akut abgestoßenen Allotransplantaten zeigten. Die akute Abstoßung beruht u.a. auf einer durch zytotoxische T-Lymphozyten medierte Immunreaktion. T-Lymphozyten lösen dabei in Zielzellen Apoptose über Fas/Fas-Ligand und GranzymeB/Perforin aus [32, 79, 125]. Eine andere Studie zeigte, daß Fas/FasL-Knockout-Mäuse Herz-Allotransplantate ebenso akut abstießen wie Wildtypmäuse, in denen FasL hochreguliert war [96]. Dies läßt auf Fas/FasL-unabhängige Mechanismen schließen läßt.

Die Apoptoseinduktion wurde in der vorliegenden Arbeit von einer zeitabhängigen Bcl-2-Degradation in ein spezifisches Degradationsprodukt von 17 kD begleitet, das am Tag 7 und 10 der akuten Abstoßung in der vollständigen Degradation des Bcl-2 Gesamtlängen-Proteines resultierte. Die Bcl-2-Degradation war nicht auf eine veränderte mRNA-Menge zurückzuführen, sondern erfolgte posttranslational auf Proteinebene. Ein in vitro-Assay zur näheren Charakterisierung der Bcl-2-Proteolyse mit pharmakologischen Inhibitoren ergab, daß die Bcl-2 Degradation durch eine Serinprotease induziert wird (siehe Abb. 47).

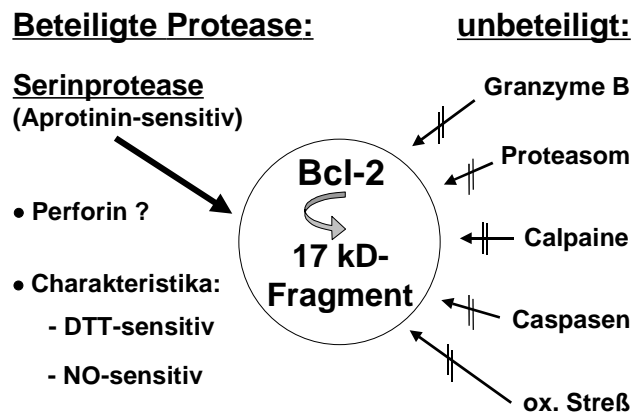


Abb. 47: Bcl-2-Proteolyse in akut abgestoßenen Herz-Allotransplantaten. Eingrenzung der verantwortlichen Protease(n) anhand der Ergebnisse des radioaktiven in vitro-Assays. ox. = oxidativer.

Des weiteren ließ sich die für die Bcl-2 Proteolyse verantwortliche(n) Serin-Protease(n) partiell durch Perforin-Inhibitoren hemmen, was auf einen durch Perforin mediierten Mechanismus hinweist. Da jedoch sehr hohe Konzentrationen des Inhibitors erforderlich waren, ist ein unspezifischer Effekt nicht auszuschließen.

Serinproteasen, wie Granzyme B [32], sind an der durch T-Lymphozyten induzierten Apoptose beteiligt und könnten vielleicht auch für die Bcl-2 Degradation verantwortlich sein. Granzyme B-Inhibitor hatte jedoch keinen Effekt. Zusammen mit der Beteiligung von Perforin an der Bcl-2 Degradation in der akuten Abstoßung läßt sich vermuten, daß Perforine, kombiniert mit andere Effektoren als Granzyme B, beteiligt sein müssen.

Der zweite Hauptmechanismus der durch T-Lymphozyten induzierten Apoptose, nämlich Fas/Fas-Ligand, scheint keine Bedeutung in der Bcl-2 Proteolyse zu haben, da die Hemmung der Caspasen keinen Einfluß auf die Bcl-2 Degradation hatte und Fas-Ligand in akut abgestoßenen Herzen herunter reguliert wurde [163]. Diese Ergebnisse lassen einen zusätzlichen Signaltransduktionsweg neben Perforin/Granzyme B und Fas/Fas-Ligand vermuten, durch den T-Lymphozyten Einfluß auf Zielzellen nehmen.

Die Bcl-2 Proteolyse in der vorliegenden Arbeit scheint durch eine NO-sensitive Protease induziert zu werden. In vitro konnte NO die Bcl-2 Degradation hemmen [38]. Eine protektive Wirkung von L-Arginin auf die Herz- und Endothelfunktion konnte in der der Transplantation folgenden Reperfusion gezeigt werden [166]. Im Gegensatz dazu

resultierte die Hemmung der iNOS in verminderter akuter Abstoßung [178]. Zudem wurde die iNOS-Expression in akut abgestoßenen Allotransplantaten in Ratten [167, 178] und in humanen Biopsien [168] induziert und zeigte den gleichen Zeitverlauf wie die Apoptose. Diese Ergebnisse weisen auf eine protektive Rolle von NO durch Aufrechterhaltung der Herzfunktion in der sehr frühen Transplantationsphase (<24 Stunden) hin, während nach wenigen Tagen eine der Apoptose parallel verlaufenden Induktion der iNOS zytotoxische Wirkung zu haben scheint.

Verluste des antiapoptotischen Bcl-2 in der akuten Abstoßung könnten für die Induktion der Apoptose verantwortlich sein. Für Caspasen wurde gezeigt, daß sie in vitro sowohl Bcl-2 [30] als auch Bcl-x_L [31] durch Abspaltung der BH4-Domäne in Bax-ähnliche Degradationsprodukte mit proapoptotischer Wirkung spalten können. So könnten analog zu diesen Mechanismen in der akuten Abstoßung Todessignale vorhanden sein, die unter der Beteiligung einer Serin-Protease die Spaltung von Bcl-2 in ein proapoptotisch wirksames, 17 kD großes Degradationsprodukt bewirken.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse eine proteolytische Spaltung von Bcl-2 durch eine Serinprotease(n) während der akuten Abstoßung, die von Apoptose begleitet wird. Es wurde gezeigt, daß Bcl-2 durch den Ubiquitin-Proteasomenkomplex degradiert wurde [40] und daß Antioxidantien die Bcl-2 Degradation in HUVEC hemmten [58]. Bcl-2 scheint in der akuten Abstoßung jedoch durch eine andere, noch zu identifizierende Protease in ein 17 kD großes Produkt gespalten zu werden, da weder Inhibitoren des Proteasomenkomplexes, noch Antioxidantien oder Caspase-Inhibitoren einen Effekt hatten.

Die Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen könnten zur Entwicklung neuer therapeutischer Ziele führen, um die Gefahr der akuten Abstoßung in der Herztransplantation zu minimieren.

5.1.3 Apoptose in Ischämie und Reperfusion

Die Untersuchung der Apoptose in Ischämie und Reperfusion in der vorliegenden Arbeit zeigt, daß Ischämie von 30 Minuten nur in einer sehr geringen Erhöhung der (apoptotischen) TUNEL-positiven Zellen resultierte. Zusätzliche Reperfusion (30 Minuten) dagegen führte zu einem 8-fachen Anstieg TUNEL-positiver Zellen. Zudem konnte in der Reperfusion eine für Apoptose charakteristische DNA-Leiter gezeigt werden. Die erhöhte Apoptose ließ sich auf Kardiomyozyten-Zelltod zurückführen, da die Versuche an isoliert perfundierten Rattenherzen durchgeführt wurden und deshalb Apoptose durch infiltrierende Zellen, wie Monozyten oder Lymphozyten, ausgeschlossen werden kann. So erlaubte dieser Versuchsansatz die direkte Untersuchung des Einflusses von Ischämie und Reperfusion auf Kardiomyozyten unter Ausschluß zusätzlicher Effekte infiltrierender inflammatorischer Zellen. Die Ergebnisse, daß Reperfusion Apoptose induziert, während Ischämie geringe Effekte hat, wurden auch in verschiedenen anderen Studien bestätigt [18, 56, 80]. Im Gegensatz dazu demonstrierte eine Studie, daß in der Ischämie mit Maximalwerten nach 30 Minuten ohne zusätzliche Reperfusion TUNEL-positive Zellen zu detektieren waren. Es konnte aber keine typische DNA-Leiter gezeigt werden, so daß man bei dieser Studie von einem ähnlichen Ausmaß TUNEL-positiver Zellen wie in der vorliegenden Arbeit ausgehen kann [29].

Reperfusions-induzierte Apoptose korrelierte nicht mit Modulation der Proteinlevel von Bcl-2 und Bax. Im Gegensatz zu einer Bcl-2-Reduktion, die in zerebraler Ischämie gezeigt werden konnte, resultiert 30-minütige Ischämie, gefolgt von 30-minütiger Reperfusion in isoliert perfundierten Herzen nicht mit einer Verminderung von Bcl-2. Ebenso blieben Bax-Proteinlevel unbeeinflusst, was im Gegensatz zu anderen Publikationen steht, die erhöhte Bcl-2-Expression im akuten Myokard-Infarkt und erhöhte Bax-Expression im alten Infarkt [119] und erhöhte Verhältnisse von Bcl-2 zu Bax nach Ischämie in Ratten gezeigt haben [104]. Die Unterschiede lassen sich durch die unterschiedlichen Modelle und die späteren Untersuchungszeitpunkte (ab 6 Stunden bzw. 1 Stunde) erklären. In zerebraler Ischämie scheint Bax hochreguliert [4] und mit TUNEL-positiven Zellen kolokalisiert zu sein [47, 73].

Es konnte gezeigt werden, daß Reperfusion die Caspase-Kaskade aktiviert. So konnte die aktive Untereinheit p17 der Caspase-3 nach 30 Minuten Reperfusion detektiert werden,

was auf eine proteolytische Aktivierung der Caspase-3 hinweist. Es konnte eine eindeutige Beteiligung der Caspase-3 in Ischämie/Reperfusion-induzierten Schäden demonstriert werden, was die Ergebnisse von Yaoita et al. [182] bestätigt, der eine verminderte Infarktgröße mit verminderter Zahl apoptotischer Zellen im Herzen durch Hemmung der Caspasen gezeigt hat. Diese und andere Publikationen konnten die Immunreaktivität von ICE [52] oder Caspase-3 [93] in apoptotischen Geweben zeigen, was durch die konstitutive Expressierung inaktiver Proenzyme keine Aussage über die Enzymaktivität zuläßt. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit endogene Caspase-Spaltungsaktivität und die aktive Untereinheit p17 im Western Blot nachgewiesen werden.

5.1.4 Bedeutung von NO auf die Apoptose in Ischämie und Reperfusion

Die Hemmung der endogenen NO-Synthese resultierte in einer synergistischen Verstärkung der durch Ischämie/Reperfusion induzierten Apoptose. NO scheint deshalb Kardiomyozyten vor Apoptose zu schützen, was eine protektive Rolle von NO gegen Apoptose vermuten läßt. Dies wurde durch kürzlich publizierte Daten bestätigt. Das Substrat der NO-Synthase L-Arginin und NO-Donoren [55, 132] verlängerten Kardiomyozyten-Überleben, verbesserten die Wiederherstellung der Herzfunktion in der Reperfusion [24, 76], wirkten sich positiv auf die Transplantatfunktion in der Reperfusion aus [166] und resultierten in einer verringerten Infarktgröße [175]. Die Hemmung der endogenen NO-Synthese hingegen verschlechterte die hämodynamische Funktion [24] und resultierte in einer metabolischer Dysfunktion [131]. Im Gegensatz dazu zeigten andere Studien, daß die Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) zu Kardiomyozyten-Apoptose führte [142, 165] und Hemmung der endogenen NO-Synthese Apoptose verhinderte [175] sowie zu einer schnelleren Wiederherstellung der mechanischen Funktion des Herzens in der Reperfusion führte [183].

Diese konträren Ergebnisse im Vergleich zu den vorliegenden Daten können durch die unterschiedlichen Versuchsaufbauten erklärt werden. Der verwendete Versuchsansatz von 30 Minuten Ischämie läßt einen Einfluß der iNOS ausschließen, da diese Zeit zu kurz ist, um die iNOS-Expression zu induzieren.

Die synergistische Induktion der Apoptose durch Hemmung der endogenen NO-Synthese in Ischämie und/oder Reperfusion scheint der Aktivierung der Caspase-Kaskade zuzuschreiben zu sein. So war sowohl die Caspase-3 Spaltungsaktivität in LNMMA-behandelten Herzen erhöht sowie die aktive Untereinheit p17 im Western Blot detektierbar. Dies könnte durch hemmende NO-Effekte auf die Caspase-3, wie der S-Nitrosylierung essentieller Cystein-Reste im katalytisch aktiven Zentrum, erklärt werden. Diese Hypothese wird durch Befunde unterstützt, die S-Nitrosylierung von Caspase-3 durch verschiedene NO-Donoren sowohl in vitro [59] als auch in vivo in Caspase-3 überexprimierenden COS 7-Zellen [153] zeigten, wodurch Caspase-induzierte Bcl-2 Spaltung und mitochondrielle Cytochrom c Freisetzung gehemmt wurden [84]. Die Hemmung der endogenen NO-Produktion könnte somit zu einer erhöhten Caspase-3-Aktivität und somit zur Apoptose führen, da ein leichter Anstieg der DNA-Fragmentierung durch LNMMA-Gabe in Kontrollherzen gezeigt werden konnte.

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse eine protektive Rolle von Stickstoffmonoxid gegen Apoptose-Induktion durch Beeinflussung von Apoptose-Signaltransduktionswegen vermuten, was zu geringeren Zellverlusten und einer verbesserten Herzfunktion in der Reperfusion führt. Häufig wird die protektive Rolle von NO in Ischämie und Reperfusion auf seine Radikalfänger-Funktion zurückgeführt [115, 159], wohingegen die vorliegenden Ergebnisse auf alternative Mechanismen von NO, wie Beeinflussung von Schlüsselenzymen der Apoptose-Signaltransduktion, hinweisen.

5.1.5 Bedeutung der Apoptose in der Hypoxie

Ein wichtiges Merkmal der Ischämie stellt die Hypoxie mit einer verminderten Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff dar. In der vorliegenden Arbeit sollte die Apoptose sowohl in der kurzzeitigen Ischämie als auch in der chronischen Hypoxie untersucht werden.

Die Induktion von Apoptose konnte in Ratten- und Mäuseherzen gezeigt werden, die für 21 Tage in hypoxischer Atmosphäre (10% O₂) gehalten wurden. Die durch Hypoxie ausgelöste Apoptose wurde bisher hauptsächlich in neuronalen Zellen untersucht. So führte Hypoxie über Ceramid zur Aktivierung der Caspase-Kaskade [184]. Aktivierung der

Caspase-2 und -3 sowie der Cytochrom c-Freisetzung resultierte in PARP-Spaltung und DNA-Fragmentierung [5].

In Rattenherzen korrelierte die Apoptoseinduktion durch Hypoxie mit einer Erhöhung von Bax bei gleichzeitiger Reduktion von Bcl-2. Die daraus resultierende Reduktion des Verhältnisses von Bcl-2 zu Bax könnte für die Induktion der Apoptose verantwortlich sein. Die veränderten Mengen an Bcl-2 und Bax könnten auf p53-abhängige Prozesse zurückzuführen zu sein, da p53 Protein durch Hypoxie verdoppelt wurde. Allerdings war diese Verdopplung aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant. Eine genauere Beurteilung der p53-Regulation durch Hypoxie wäre durch einen erweiterten Stichprobenumfang möglich. Die Induktion der Apoptose durch Hypoxie in Mäuseherzen korrelierte mit erhöhtem Bax Protein bei gleichbleibendem Bcl-2 Protein, was ebenfalls in einem veränderten Verhältnis von Bcl-2 zu Bax resultierte. Über die Regulation der Bcl-2-Familie in der Hypoxie ist bisher wenig bekannt. In neuronalen Zellen konnten eine Verminderung von Bcl-2 bei unverändertem (kortikale Neuronen, [170]) oder erhöhten Bax (Astrozyten, [169]) gezeigt werden, was zur Aktivierung der Caspase-Kaskade und nachfolgender Apoptose führte. Die Reduktion von Bcl-2 Protein in hypoxischen Regionen von Tumoren konnte auf den durch *Hypoxie induzierbaren Faktor-1 α* (HIF-1 α) zurückgeführt werden [28]. Durch HIF-1 α erfolgt die Adaption der Zelle an die Hypoxie zur Wiederherstellung der Sauerstoffhomöostase. So könnte die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Reduktion von Bcl-2 in hypoxischen Rattenherzen auf Aktivierung von HIF-1 α zurückzuführen sein.

Hypoxie induzierte in neuronalen Zellen [8] ebenso p53-abhängig Apoptose wie in der Kardiomyozyten-Zellkultur [105]. In Mäusen dagegen konnte p53-unabhängige Apoptose im Myokardinfarkt gezeigt werden, die auf hypoxischen Regionen beschränkt war [18]. p53-Knockout-Mäuse entwickelten ebenso wie Wildtypmäuse Apoptose nach Koronarverschluss [18].

Zusammen mit den hier vorgestellten Ergebnissen läßt sich daraus schließen, daß die Apoptose in der Hypoxie durch p53-abhängige und -unabhängige Prozesse induziert wird.

5.1.6 Bedeutung der Apoptose in NO-Synthase-Knockout-Mäusen

Um die Beteiligung von NO an der Apoptosemodulation zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Herzen von NOS-Knockout-Mäuse untersucht. Da gezeigt wurde, daß HIF-1 α die iNOS induziert [117], sollte zudem die Bedeutung von NO in der Hypoxie untersucht werden. Die Ergebnisse können allerdings nur Tendenzen aufzeigen, da nur ein geringer Stichprobenumfang von n=2 (wt- und eNOS-Knockout-Mäuse) bzw. n=3 (iNOS-Knockout-Mäuse) zur Verfügung standen.

Es konnte gezeigt werden, daß Knockout der eNOS Apoptose induzierte, während der iNOS-Knockout in keiner deutlichen Fragmentierung resultierte. Die Apoptose wurde im eNOS-Knockout von erhöhten Bax Protein im Vergleich zu normoxischen wt-Mäusen begleitet, während iNOS-Knockout in einer verminderten Bax-Expression führte. Bei nur leicht erhöhten Bcl-2 Mengen in eNOS-Knockout-Mäusen verringerte sich das Bcl-2 zu Bax Verhältnis.

Um die Rolle von NO in der durch Hypoxie induzierten Apoptose zu untersuchen, wurden NOS-Knockout-Mäuse, die für 21 Tage in hypoxischer Atmosphäre (10% O₂) gehalten wurden, analysiert. Hypoxie in NOS-Knockout-Mäusen resultierte ebenso in Apoptose, die im Vergleich zur Normoxie mit erhöhtem Bax Protein bei gleichbleibendem Bcl-2 einherging. In Astrozyten konnte durch Hypoxie über Hochregulation der iNOS Apoptose induziert werden, die von vermindertem Bcl-2 und erhöhten Bax begleitet war [169]. Die Induktion von Bax in der Hypoxie könnte aus der Induktion von HIF-1 α resultieren.

Zu klären bleibt die Frage, ob durch Knockout einer NOS-Isoform die anderen Isoformen reguliert werden. Die vorliegende Arbeit läßt eine gegenseitige Regulation der verschiedenen Isoformen vermuten, da in Herzen von iNOS-Knockout-Mäusen eNOS-Protein hochreguliert wurde. Zudem konnte in Lungen gezeigt werden, daß in iNOS-Knockout-Mäusen eNOS-Protein herabreguliert worden ist, während sich in eNOS-Knockout-Mäusen iNOS-Protein erhöhte [140]. Indirekte Hinweise geben zudem die Befunde, daß NO aus der nNOS-Aktivität in neuronalen Zellen NF κ B inhibierte, woraus wiederum eine verminderte iNOS-Expression resultierte [173].

5.1.7 Zusammenfassung: Apoptose in kardialen und kardiovaskulären Erkrankungen

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Beteiligung der Apoptose von VSMCs in fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques, in akut abgestoßenen Herztransplantaten und in Ischämie folgenden reperfundierten Herzen sowie der Hypoxie gezeigt werden (Tabelle 9).

Tabelle 9: Zusammenfassung der Apoptose in den untersuchten Tiermodelle kardialer Erkrankungen.

Erkrankung/ Dysfunktion	Modell	Apoptose	mögliche regulatorische Proteine		
			Bax	Bcl-2	andere
Hyperlipidämie • Diät-induziert • genetische	Kaninchen Wildtyp	-	↑	↔	p53 ↔
	FFH-Kaninchen	+	↑↑	↔	p53 ↔
akute Allotrans- plantatabstoßung	Ratten (WF → Lew)	+	↑	↓	(totale Bcl-2-Proteolyse in 17 kD-Produkt)
Ischämie/Reperfusion • Hemmung NOS	Rattenherzen (WF)	I: (+) R: +	↔	↔	Caspase-3-Spaltung in p17, Caspase-Spaltungsaktivität
	Rattenherzen (WF)	I: ++ R: ++	↔	↔	
Hypoxie	Ratten (WF)	+	↑	↓	p53 (↑)
	Mäuse (C57BL6)	+	↑	↔	
NOS-Knockout • eNOS-/- • iNOS-/-	-/-Mäuse				
	Normoxie	+	↑	↔	
	Hypoxie	+	↑	↔	
	Normoxie	-	↓	↔	
	Hypoxie	+	↔	↔	

↑ = Anstieg/↓ = Reduktion/↔ = unverändert im Vergleich zu unbehandelten Kontrollherzen. + = Apoptose detektierbar, - = keine Apoptose detektierbar. WF = Wistar Furth Ratten, Lew = Lewis-Ratten, -/- = Knockout. () = geringe Regulation.

Während in der akuten Abstoßung von Herztransplantaten und der Hypoxie eine Degradation von Bcl-2 gezeigt werden konnte, wurde Bcl-2 in hyperlipidämischen Kaninchenarterien und in Ischämie/Reperfusion nicht reguliert. Alle Modelle, mit Ausnahme der Ischämie/Reperfusion resultierten in einer Erhöhung von Bax. In allen Modellen konnte eine p53-unabhängige Apoptose-Induktion gezeigt werden, nur in der Hypoxie in Ratten zeigte sich eine Tendenz der erhöhten p53 Expression. Zellkulturversuche zeigten, daß Hypoxie p53-abhängig Apoptose in Kardiomyozyten induzierte

[105] und p53 VSMCs transient für Fas-induzierte Apoptose sensibilisiert [15]. Okklusion der Koronararterien in p53-Knockoutmäusen dagegen resultierte ebenso in DNA-Fragmentierung wie in Wildtypmäusen [18], was auf p53 unabhängige Apoptoseinduktion schließen läßt. Zusammen mit den Ergebnissen, daß p53-Überexpression in VSMCs keine Apoptose induziert, wohingegen zusätzliche Expression von c-myc und E1A in Apoptose resultierten [13], scheint die Apoptose *in vivo* durch Kombination multipler Signaltransduktionswege - p53-abhängig und -unabhängig - moduliert zu werden.

Zusammenfassend läßt sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit schließen, daß durch Apoptose bedingte Zellverluste an der Pathogenese verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt sind. Dabei scheinen die zugrundeliegenden Mechanismen jedoch spezifische Charakteristika in verschiedenen Erkrankungen aufzuweisen, deren genauere Aufklärung interessante Ziele künftiger präventiver und therapeutischer akuter Maßnahmen versprechen. Bei längerfristiger Behandlung, die auf Unterdrückung der Apoptose und Auslösern von Apoptose zielen, sollten die möglichen Komplikationen, wie z. B. Tumorentwicklung, bedacht und minimiert werden.

5.2 TNF- α induzierte Degradation der eNOS in HUVEC

Die endotheliale NO-Synthase der Endothelzellen hat eine Schlüsselrolle in der Signalübertragung aus dem Blut in die darunterliegenden vaskulären glatten Muskelzellen. Unzureichende Aktivität der endothelialen NO-Synthase könnte eine Ursache für verschiedene pathophysiologische Zustände in der kardiovaskulären Biologie sein. Die Untersuchung der Apoptose in den verschiedenen Tiermodellen der vorliegenden Arbeit weisen auf protektiver NO-Effekte hin, wobei besonders von der eNOS produziertes NO antiapoptotisch zu wirken scheint (vgl. 5.1.3.1, 5.1.4 und 5.1.4.1). In Endothelzellkulturen konnte zudem gezeigt werden, daß Stickstoffmonoxid protektive, antiapoptotische Effekte hat. Außerdem demonstrierten Versuche an Ratten, daß die chronische Hemmung der NO-Synthese in einer erhöhten Expression der Adhäsionsfaktoren ICAM-1 und VCAM-1 und der nachfolgenden Infiltration inflammatorischer Zellen resultierte [106]. Monozyten-

adhäsion führte zu einer Reduktion von eNOS Protein [113] und Hemmung der NO-Synthese mit L-NAG induzierte die MCP-1-Expression [186]. Deshalb sollte in der HUVEC-Zellkultur untersucht werden, welchen Einfluß das proinflammatorische Zytokin TNF- α auf das eNOS-Protein und dessen Aktivität hat.

Koinkubation von HUVEC mit TNF- α und dem Proteinsyntheseinhibitor Zykloheximid (CHX) resultierte in einer Verstärkung der TNF- α induzierten Degradation der eNOS. Proteine werden in Zellen hauptsächlich über zwei verschiedene Wege, nämlich in Lysosomen oder durch den Ubiquitin-Proteasomenkomplex, abgebaut. Die pharmakologische Hemmung des Proteasoms resultierte in TNF/CHX behandelten Zellen in einer Hemmung der eNOS-Degradation, während in TNF- α behandelten Zellen kein Effekt zu beobachten war. Die indirekte Messung der eNOS-Aktivität zeigte ähnliche Effekte: Inhibition des Proteasoms hemmte die durch TNF/CHX induzierte Reduktion der eNOS-Aktivität, hatte jedoch keinen Einfluß auf die durch TNF- α induzierte Aktivitätsverminderung. Die Ergebnisse, daß TNF- α in einer Reduktion des eNOS Proteines resultierte, wird durch die Befunde unterstrichen, daß TNF- α die Menge der eNOS durch eine reduzierte mRNA-Stabilität verminderte [182]. Die TNF/CHX-Effekte der vorliegenden Arbeit wiesen jedoch auf eine posttranskriptionellen Regulation hin und lassen zudem die Beteiligung eines Proteines vermuten, welches als Antwort auf TNF- α durch den Proteasomenkomplex degradiert wird, woraufhin auch die eNOS abgebaut wird. Die eNOS selbst scheint nicht durch den Proteasomenkomplex abgebaut zu werden, da bei Inkubation mit TNF- α alleine die Hemmung des Proteasoms keinen Einfluß auf die Reduktion der Proteinmenge hatte. So läßt sich aus den TNF/CHX-Ergebnissen die Hypothese formulieren, daß es einen Interaktionspartner der eNOS gibt, der eine Schutzfunktion ausübt, um die Degradation der eNOS zu verhindern.

Die eNOS(-Aktivität) kann, obwohl sie konstitutiv exprimiert ist, auf mRNA- und auf Proteinebene reguliert werden (Review, [64]). Nachdem die Interaktion mit anderen Proteinen als wichtiger Regulationsmechanismus der konstitutiv exprimierten NO-Synthasen (nNOS [21, 77] und eNOS) beschrieben wurde, sollte untersucht werden, ob auch die TNF/CHX-vermittelte Degradation über die Interaktion mit assoziierten Proteinen gesteuert wird.

Die Hitzeschock-Proteine sind durch ihre Funktion als Chaperone am Transport und Schutz von Proteinen als Antwort auf zellulären Streß beteiligt. Kürzlich konnte gezeigt

werden, daß durch eNOS-aktivierende Agonisten (wie VEGF und Schubspannung) die Komplexbildung von eNOS mit HSP90 induziert wird, wodurch die eNOS-Aktivität erhöht wurde [50]. In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, daß TNF/CHX HSP90 Protein zeitabhängig degradiert, was eventuell auf eine Rolle der HSP90-Interaktion für die Degradation der eNOS spricht. Die Aufhebung der HSP90-eNOS-Interaktion könnte somit ein Signal für die Degradation darstellen.

Ein weiteres Hitzeschockprotein, das in gestreßten Zellen exprimiert wird, ist HSP70. So konnte HSP70 in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden. Die HSP70-Expression wurde durch oxLDL in Endothel- [188] und vaskulären glatten Muskelzellen [189], durch Ischämie/Reperfusion [112, 141] sowie durch Hypoxie, wodurch postischämische Schäden vermindert wurden, induziert. Der Zusammenhang zwischen NO und HSP70 wird kontrovers diskutiert. In Hepatozyten konnte durch exogene NO-Donoren über Induktion der HSP70 Expression die durch TNF- α induzierte Apoptose gehemmt werden [83]. Weiterhin ergaben Untersuchungen an Ratten, daß die endogene Bildung von NO [109] und die Gabe exogener NO-Donoren [110] zur HSP70-Induktion führt. Dagegen zeigten Zellkulturversuche, daß Hitzeschock in Astrozyten über Induktion von HSP70 zu einer verminderten iNOS-Expression über verminderte NF κ B-Aktivierung führte [45] und Überexpression von HSP70 in Ratten Insulinom-Zellen in der Hemmung zytotoxischer NO-Effekte resultierte [11]. Die Koinkubation von TNF/CHX in HUVEC in der vorliegenden Arbeit führte nicht zu einer zeitabhängigen Regulation von HSP70, wodurch ein Einfluß auf die beobachteten Effekte unwahrscheinlich scheint.

Caveolin-1 ist ein bekannter, die Enzymaktivität hemmender Interaktionspartner der eNOS [46], der für die Lokalisation der eNOS auf Caveolae verantwortlich ist. Agonisten der eNOS bewirken eine Dissoziation von Caveolin-1 und damit eine Translokation ins Cytosol [147]. Untersuchung der Wirkung von TNF/CHX der vorliegenden Arbeit zeigte keine Regulation von Caveolin-1-Protein.

Erste Immunpräzipitationen zeigten ein eNOS-assoziiertes Protein mit einer Größe von ungefähr 70 kD, das ebenfalls durch TNF/CHX reduziert wurde. Allerdings ließ sich dieses Protein nicht ansequenzieren, da vermutlich eine N-terminale Blockade vorhanden war. Daher konnte in der vorliegenden Arbeit nicht die Identität des assoziierten Proteines geklärt werden. Zusammengefaßt lassen diese Ergebnisse einen neuen Interaktionspartner der eNOS vermuten, dessen Identifizierung neue Aufschlüsse über die Regulation der

eNOS versprechen. Für eine genauere Charakterisierung der eNOS-Proteolyse sind jedoch weitere Experimente notwendig. Die Reduktion von eNOS-Protein durch TNF/CHX begleitet von reduzierter NO-Produktion durch TNF könnten die protektiven NO-Effekte auf die Apoptose erklären.

Die weitere Aufklärung der Mechanismen, die zu verminderter NO-Produktion führen und der Nachweis deren Relevanz im *in vivo* System, versprechen neue Ansätze zur Entwicklung medikamentöser Therapien verschiedener Herzerkrankungen zu finden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit konnte die Beteiligung der Apoptose in verschiedenen kardialen und kardiovaskulären Erkrankungen gezeigt werden sowie Aufschlüsse über die zugrundeliegenden Signaltransduktionen gewonnen werden.

Die Beteiligung der Apoptose wurde in **genetisch- und fütterungsinduzierter Hyperlipidämie** gezeigt. In fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques (genetisch induzierter Hyperlipidämie) korrelierte Apoptose von glatten Muskelzellen und Makrophagen mit stark erhöhter Bax-Expression, während Bcl-2 nicht reguliert wurde. Nach 12-wöchiger hyperlipidämischer Diät waren trotz stark erhöhter Serum-Cholesterinwerte keine morphologischen Veränderungen der Aorten zu beobachten. Es konnte eine verdoppelte Bax-Expression in Endothelzellen gezeigt werden, was auf eine Beteiligung der Apoptose hinweist. Die erhöhte Bax-Expression scheint mit erhöhtem Serum-LDL in beiden Modellen zu korrelieren, was die Induktion der Apoptose durch LDL vermuten lässt. Die Apoptose in **akut abgestoßenen allogenen Herz-Transplantaten** war von einer erhöhten Bax-Expression und einer posttranslationalen Degradation von Bcl-2 in ein 17 kD großes Degradationsprodukt durch eine Serinprotease, die DTT- und NO-sensitiv ist, gekennzeichnet. Neben der gezeigten Beteiligung des Perforin-Signaltransduktionsweges scheinen noch andere, bisher nicht identifizierte Proteasen beteiligt zu sein.

Die physiologische Relevanz protektiver Effekte von Stickstoffmonoxid (NO) auf die Apoptose konnte sowohl in **Ischämie/Reperfusion** als auch durch die Untersuchung von **eNOS-Knockout-Mäusen** gezeigt werden. Die Hemmung der endogenen NO-Synthese während Ischämie und Reperfusion führte zu einer synergistischen Induktion der Apoptose. Zusammen mit dem Nachweis der erhöhten Caspase-Spaltungsaktivität lassen diese Ergebnisse die Hemmung der Kardiomyozytenapoptose durch NO über eine Beeinflussung der Caspase-Kaskade vermuten. Die protektive Rolle der endogenen NO-Synthese wurde durch die Apoptoseinduktion in eNOS-Knockout-Mäusen, welche mit erhöhter Bax-Expression korrelierte, unterstrichen.

Da proatherosklerotische und proinflammatorische Faktoren die NO-Freisetzung hemmen können, wurde die **Regulation der Proteinexpression der eNOS** durch TNF- α (unter Hemmung der Proteinsynthese mit CHX) in der Endothelzellkultur (HUVEC) untersucht. Die apoptotischen Stimuli TNF/CHX resultierten in der Proteolyse der eNOS und der

verminderten eNOS-Aktivität in der HUVEC-Kultur, was auf die antiapoptotische Bedeutung der eNOS hinweist. Zudem lassen die Ergebnisse die Beteiligung eines Proteines vermuten, welches mit der eNOS interagiert, da die Hemmung des Proteasomenkomplexes nur bei Koinkubation von TNF- α mit CHX die Reduktion des eNOS-Proteines inhibierte. Die eNOS selbst schien nicht durch den Proteasomenkomplex abgebaut zu werden, da in TNF- α -behandelten HUVEC der Proteasomenkomplexinhibitor ZLLLH keinen Effekt auf die eNOS-Reduktion hatte. So läßt sich aus diesen Ergebnissen die Hypothese formulieren, daß durch TNF/CHX ein mit der eNOS interagierendes Schutzprotein über den Proteasomenkomplex abgebaut wird, woraus dann die Degradation der eNOS resultiert.

HSP 90 könnte ein Interaktionspartner der eNOS sein und dieses vor Degradation schützen, während HSP 70 und Caveolin-1 keine Bedeutung hatten. Immunpräzipitationen gegen eNOS zeigten ein assoziiertes Protein mit einer Größe von ungefähr 70 kD.

Das assoziierte Protein muß allerdings noch identifiziert und der Wirkungsmechanismus noch näher charakterisiert werden.

TEILPUBLIKATIONEN

Haendeler, J., **Weiland, U.**, Zeiher, A.M., Dimmeler, S. (1997). Effects of redox-related congeners of NO on apoptosis and caspase-3 activity. *Nitric oxide: Biology and Chemistry*, 1 (4): 282-293.

Dimmeler, S., Rippmann, V., **Weiland, U.**, Haendeler, J., Zeiher, A.M. (1997). Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ. Res.*, 81: 970-976.

Weiland, U., Haendeler, J., Ihling, C., Albus, U., Scholz, W., Dimmeler, S (1998). Inhibition of endogenous nitric oxide synthase potentiates ischemia/reperfusion-induced myocardial apoptosis via a caspase-3 dependent pathway. *Circulation*, 98, 17 (Suppl.): I-731 (Abstract)

Dimmeler, S., **Weiland, U.**, Ruetten, H. (1998). Hypercholesterolemia-induced apoptotic cell death in atherosclerotic lesions is associated with dramatic up-regulation of Bax. *Circulation*, 98, 17(Suppl.): I-383 (Abstract)

Stadlbauer, T. H. W., **Weiland, U.**, Schaub, M., Haendeler, J., Sayeh, M. H., Zeiher, A. M., Dimmeler, S. (1998). Apoptosis is an effector mechanism of acute cardiac allograft rejection: involvement of proteolytic degradation of Bcl-2. *Circulation*, 98, 17(Suppl.): I-263 (Abstract)

LITERATURVERZEICHNIS

1. **Adachi, S., Cross, A. R., Babior, B. M., Gottlieb, R. A. (1997).** Bcl-2 and the outer mitochondrial membrane in the inactivation of cytochrome c during Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 272, 21878-21882.
2. **Adams, J. M., Cory, S. (1998).** The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.
3. **Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., Yuan, J. (1996).** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.
4. **Antonawich, F. J., Krajewski, S., Reed, J. C., Davis, J. N. (1998).** Bcl-x(1) Bax interaction after transient global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 18, 882-886.
5. **Araya, R., Uehara, T., Nomura, Y. (1998).** Hypoxia induces apoptosis in human neuroblastoma SK-N-MK cells by caspase activation accompanying cytochrome c release from mitochondria. *FEBS Lett* 439, 168-172.
6. **Arnal, J.-F., Yamin, J., Dockery, S., Harrison, D. G. (1994).** Regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA, protein and activity during cell growth. *Am J Physiol. (Cell Physiol.)* 36, C1381-1388.
7. **Ashkenazi, A., Dixit, V. M. (1998).** Death receptors: signalling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.
8. **Banasiak, K. J., Haddad, G. G. (1998).** Hypoxia-induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death. *Brain Res* 797, 295-304.
9. **Bardales, R. H., Hailey, L. S., Xie, S. S., Schaefer, R. F., Hsu, S.-M. (1996).** In situ apoptosis assay for the detection of early acute myocardial infarction. *Am J Pathol* 149, 821-829.
10. **Bauriedel, G., Schluckebier, S., Hutter, R., Welsch, U., Kandolf, R., Lüderitz, B., Prescott, M. F. (1998).** Apoptosis in restenosis versus stable angina atherosclerosis. Implications for the pathogenesis of restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18, 1132-1139.
11. **Bellmann, K., Jäättelä, M., Wissing, D., Burkart, V., Kolb, H. (1996).** Heat shock protein hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide. *FEBS Letters* 391, 185-188.

12. **Bennett, M. R., Evan, G. I., Schwartz, S. M. (1995).** Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* *95*, 2266-2274.
13. **Bennett, M. R., Schwartz, S. M. (1995).** Apoptosis of rat vascular smooth muscle cells is regulated by p53-dependent and -independent pathways. *Circ. Res.* *77*, 266-273.
14. **Bennett, M. R., Gibson, D. F., Schwartz, S. M., Tait, J. F. (1995).** Binding and phagocytosis of apoptotic vascular smooth muscle cells is mediated in part by exposure of phosphatidylserine. *Circ. Res.* *77*, 1136-1142.
15. **Bennett, M. R., Macdonald, K., Chan, S.-W., Luzio, J. P., Simari, R., Weissberg, P. (1998).** Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* *282*, 290-293.
16. **Bensadoun, A., Weinstein, D. (1976).** Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem* *70*, 241-250.
17. **Bergese, S. D., Klenotic, S. M., Wakely, M. E., Sedmak, D. D., Orosz, C. G. (1997).** Apoptosis in murine cardiac grafts. *Transplantation* *63*, 320-325.
18. **Bialik, S., Geenen, D. L., Sasson, I. E., Cheng, R., Horner, J. W., Evans, S. E., Lord, E. M., Koch, C. J., Kitsis, R. N. (1997).** Myocyte apoptosis during myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53. *J Clin Invest* *100*, 1363-1372.
19. **Bjorkerud, B., Bjorkerud, S. (1996).** Contrary effects of lightly and strongly oxidized LDL with potent promotion of growth versus apoptosis on arterial smooth muscle cells, macrophages and fibroblasts. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* *16*, 416-424.
20. **Björkerud, S., Björkerud, B. (1996).** Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am J Pathol* *149*, 367-380.
21. **Bredt, D. S., Snyder, S. H. (1990).** Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *87*, 682-685.
22. **Brenman, J. E., Chao, D. S., Xia, H., Aldape, K., Bredt, D. S. (1995).** Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from muscle sarcolemma in duchenne muscular dystrophy. *Cell* *82*, 743-752.

23. **Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1983).** Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Ann. Rev. Biochem.* 52, 223-261.
24. **Brunner, F., Leonhard, B., Kukovetz, W. R., Mayer, B. (1997).** Role of endothelin, nitric oxide and L-arginine release in ischemia/reperfusion injury of rat hearts. *Cardiovascular Res* 36, 60-66.
25. **Buja, L. M., Eigenbrodt, M. L., Eigenbrodt, E. H. (1993).** Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med* 117, 1208-14.
26. **Busse, R. (1997)** Persönliche Mitteilung.
27. **Cai, W., Devaux, B., Schaper, W., Schaper, J. (1997).** The role of Fas APO 1 and apoptosis in the development of human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 131, 177-186.
28. **Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.-M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Derwerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C. J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R. K., Collen, D., Keshet, E. (1998).** Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394, 485-490.
29. **Chakrabarti, S., Hoque, A. N., Karmazyn, M. (1997).** A rapid ischemia-induced apoptosis in isolated rat hearts and its attenuation by the sodium-hydrogen exchange inhibitor HOE 642 (cariporide). *J Moll Cell Cardiol* 29, 3169-3174.
30. **Cheng, E. H.-Y., Kirsch, D. G., Clem, R. J., Ravi, R., Kastan, M. B., Bedi, A., Ueno, K., Hardwick, J. M. (1997).** Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278, 1966-1968.
31. **Clem, R. J., Cheng, E. H.-Y., Karp, C. L., Kirsch, D. G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M. B., Griffin, D. E., Earnshaw, W. C., Veluona, M. A., Hardwick, J. M. (1998).** Modulation of cell death by Bcl-xL through caspase interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 554-559.
32. **Clement, M. V., Haddad, P., Soulie, A. (1991).** Perforin and granzyme B as a marker for acute rejection in heart transplantation. *Int Immunol* 3, 1175-1181.
33. **Crisby, M., Kallin, B., Thyberg, J., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Kostulas, V., Nilsson, J. (1997).** Cell death in atherosclerotic plaques involve both oncosis and apoptosis. *Atherosclerosis* 130, 17-27.

34. **Devitt, A., Moffatt, O. D., Raykundalia, C., Capra, J. D., Simmons, D. L., Gregory, C. D. (1998).** Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392, 505-509.
35. **Dimmeler, S., Rippmann, V., Weiland, U., Haendeler, J., Zeiher, A. M. (1997).** Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effects of nitric oxide. *Circ. Res.* 81, 970-976.
36. **Dimmeler, S., Haendeler, J., Nehls, M., Zeiher, A. M. (1997).** Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of ICE-like and CPP32-like proteases. *J. Exp. Med.* 185, 601-608.
37. **Dimmeler, S., Haendeler, J., Galle, J., Zeiher, A. M. (1997).** Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases: a mechanistic clue to the response to injury hypothesis. *Circulation* 95, 1760-1763.
38. **Dimmeler, S., Haendeler, J., Zeiher, A. M. (1997).** Nitric oxide inhibits TNFalpha-induced degradation of Bcl-2. *FASEB J* 11, A318 (Abstract).
39. **Dimmeler, S. (1998)** Persönliche Mitteilung
40. **Dimmeler, S., Breitschopf, K., Haendeler, J., Zeiher, A. M. (1999).** Selective ubiquitin-dependent degradation of Bcl-2 links the proteasome complex with apoptosis signaling via the MAP-kinase pathway. *submitted*.
41. **Ellis, H. M., Horvitz, H. R. (1986).** Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44, 817-829.
42. **Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. (1998).** A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.
43. **Escargueil-Blanc, I., Salvayre, R., Negre-Salvayre, A. (1994).** Necrosis and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins occur through two calcium-dependent pathways in lymphoblastoid cells. *Faseb J* 8, 1075-80.
44. **Fadok, V. A., Savill, J. S., Haslett, C., Bratton, D. L., Doherty, D. E., Campbell, P. A., Henson, P. M. (1992).** Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 149, 4029-4035.
45. **Feinstein, D. L., Galea, E., Aquino, D. A., Li, G. C., Xu, H., Reis, D. J. (1996).** Heat shock protein 70 suppresses astroglial-inducible nitric oxide synthase expression by decreasing NFkB activation. *J. Biol. Chem.* 271, 17721-17732.

46. **Feron, O., Saldana, F., Michel, J. B., Michel, T. (1998).** The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J. Biol. Chem.* *273*, 3125-3128.
47. **Ferrer, I., Lopez, E., Blanco, R., Rivera, R., Ballabriga, J., Pozas, E., Marti, E. (1998).** Bcl-2, Bax, and Bcl-x expression in the CA1 area of the hippocampus following transient forebrain ischemia in the adult gerbil. *Exp Brain Res* *121*, 167-173.
48. **Förstermann, U., Schmidt, H. H., Pollock, J. S., Sheng, H., Mitchell, J. A., Warner, T. D., Nakane, M., Murad, F. (1991).** Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* *42*, 1849-1857.
49. **Fukuo, K., Hata, S., Suhara, T., Nakahashi, T., Shinto, Y., Tsujimoto, Y., Morimoto, S., Ogihara, T. (1996).** Nitric oxide induces upregulation of Fas and apoptosis in vascular smooth muscle. *Hypertension* *27*, 823-826.
50. **Garcia-Gardena, G., Fan, R., Shah, V., Sorrentino, R., Cirinos, G., Papapetropoulos, A., Sessa, W. C. (1998).** Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by HSP90. *Nature* *392*, 821-824.
51. **Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S. A. (1992).** Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* *119*, 493-501.
52. **Geng, Y.-J., Libby, P. (1995).** Evidence of apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with Interleukin-1 β -converting enzyme. *Am J Pathol* *147*, 251-266.
53. **Geng, Y. J., Wu, Q., Muszynski, M., Hansson, G. K., Libby, P. (1996).** Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *16*, 19-27.
54. **Geng, Y.-J., Henderson, L. E., Levesque, E. B., Muszynski, M., Libby, P. (1997).** Fas is expressed in human atherosclerotic intima and promotes apoptosis of cytokine-primed human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *17*, 2200-2208.
55. **Gorbunov, N. V., Tyurina, Y. Y., Salama, G., Day, B. W., Claycamp, H. G., Argyros, H. G., Elsayed, N. M. (1998).** Nitric oxide protects cardiomyocytes against tert-butyl hydroperoxide-induced formation of alkoxyl and peroxy radicals and peroxidation of phosphatidylserine. *Biochem Biophys Res Commun* *244*, 647-651.

56. **Gottlieb, R. A., Burleson, K. O., Kloner, R. A., Babior, B. M., Engler, R. L. (1994).** Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 94, 1621-1628.
57. **Granger, D. L., Hibbs, J. B. J. (1996).** High-output nitric oxide: weapon against infection ? *Trends Microbiol* 4, 46-47.
58. **Haendeler, J., Zeiher, A. M., Dimmeler, S. (1996).** Vitamin C and E prevent lipopolysaccharide-induced apoptosis in human endothelial cells by modulation of Bcl-2 and Bax. *Eur J Pharmacol* 317, 407-411.
59. **Haendeler, J., Weiland, U., Zeiher, A. M., Dimmeler, S. (1997).** Effects of redox-related conceners of NO on apoptosis and caspase-3 activity. *Nitric oxide: Biol and Chem* 1, 282-293.
60. **Hall, S. E., Savill, J. S., Henson, P. M., Haslett, C. (1994).** Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast vitronectin receptor and involvement of a mannose/fucose-specific lectin. *J Immunol* 153, 3218-3227.
61. **Han, D. K., Haudenschild, C. C., Hong, M. K., Tinkle, B. T., Leon, M. B., Liao, G. (1995).** Evidence of apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol* 147, 267-277.
62. **Han, J., Sabbatini, B., White, E. (1996).** Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1B 19K. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5857-5864.
63. **Harada, K., Chen, Z., Ishibashi, S., Osuga, J., Yagyu, H., Ohashi, K., Yahagi, N., Shionoiri, F., Sun, L., Yazaki, Y., Yamada, N. (1997).** Apoptotic cell death in atherosclerotic plaques of hyperlipidemic knockout mice. *Atherosclerosis* 135, 235-239.
64. **Harada-Shiba, M., Kinoshita, M., Kamido, H., Shimokado, K. (1998).** Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms. *J Biol Chem* 273, 9681-9687.
65. **Harrison, D. G., Sayeh, H., Ohara, Y., Inoue, N., Venema, R. C. (1996).** Regulation of expression of the endothelial cell nitric oxide synthase. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23, 251-255.
66. **Havel, R. J., Eder, H. A., Bragdon, J. H. (1955).** The distribution and chemical composition of ultracentrifugally seperated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.* 34, 1345-1353.

67. **Hegy, L., Skepper, J. N., Cary, N. R. B., Mitchinson, M. J. (1996).** Foam cell apoptosis and the development of the lipid core of human atherosclerosis. *J Pathol* 180, 423-429.
68. **Hegy, L., Hardwick, S. J., Mitchinson, M. J. (1997).** The presence of apoptotic cells in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 150, 371-373.
69. **Hermann, C., Zeiher, A. M., Dimmeler, S. (1997).** Shear stress inhibits H₂O₂-induced apoptosis of human endothelial cells by modulation of the glutathione redox cycle and nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 3588-3592.
70. **Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.-C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1997).** 14-3-3s is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Molecular Cell* 1, 3-11.
71. **Hockenbery, D. M., Oltvai, Z. N., Yin, X. M., Millman, C. L., Korsmeyer, S. J. (1993).** Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241-51.
72. **Inohara, N., Ding, L., Chen, S., Nunez, G. (1997).** Harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-xL. *EMBO J* 16, 1686-1694.
73. **Isenmann, S., Stoll, G., Schroeter, M., Krajewski, S., Reed, J. C., Bahr, M. (1998).** Differential regulation of Bax, Bcl-2, and Bcl-X proteins in focal cortical ischemia in the rat. *Brain Pathol* 8, 49-62.
74. **Isner, J. M., Kearney, M., Bortman, S., Passeri, J. (1995).** Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation* 91, 2703-2711.
75. **Itoh, G., Tamura, J., Suzuki, M., Suzuki, Y., Ikeda, H., Koike, M., Nomura, M., Jie, T., Ito, K. (1995).** DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. *Am J Pathol* 146, 1325-1331.
76. **Izhar, U., Schwalb, H., Borman, J. B., Merin, G. (1998).** Cardioprotective effect of L-arginine in myocardial ischemia and reperfusion in an isolated working rat heart model. *J Cardiovasc Surg* 39, 321-329.
77. **Jaffrey, S. R., Snyder, S. H. (1996).** PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Science* 274, 774-777.
78. **Jovinge, S., Crisby, M., Thyberg, J., Nilsson, J. (1997).** DNA fragmentation and ultrastructural changes of degenerating cells in atherosclerotic lesions and smooth muscle cells exposed to oxidized LDL in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17,

- 2225-2231.
79. **Kageyama, Y., Li, X.-K., Suzuki, S., Suzuki, H., Suzuki, K., Kazui, T., Harada, Y. (1998).** Apoptosis is involved in acute cardiac allograft rejection in rats. *Ann Thorac Surg* 65, 1604-1609.
 80. **Kajstura, J., Cheng, W., Reiss, K., Clark, W. A., Sonnenblick, E. H., Krajewski, S., Reed, J. C., Olivetti, G., Anversa, P. (1996).** Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 74, 86-107.
 81. **Kawaguchi, H., Shin, W. S., Wang, Y., Inukai, M., Kato, M., Matsuo-Okai, Y., Sakamoto, A., Uehara, Y., Kaneda, Y., Toyooka, T. (1997).** In vivo gene transfection of human endothelial cell nitric oxide synthase in cardiomyocytes causes apoptosis-like cell death. Identification using Sendai virus-coated liposomes. *Circulation* 95, 2441-2447.
 82. **Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972).** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
 83. **Kim, Y. M., de Vera, M. E., Watkins, S. C., Billiar, T. R. (1997).** Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor- α -induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J. Biol. Chem.* 272, 1402-1411.
 84. **Kim, Y.-M., Kim, T.-H., Seol, D.-W., Talanian, R. V., Billiar, T. R. (1998).** Nitric oxide suppression of apoptosis occurs in association with an inhibition of Bcl-2 cleavage and cytochrome c release. *J Biol Chem* 273, 31437-31441.
 85. **Kinscherf, R., Claus, R., Wagner, M., Gehrke, C., Kamencic, H., Hou, D., Nauen, O., Schmiedt, W., Kovacs, G., Pill, J., Metz, J., Deigner, H.-P. (1998).** Apoptosis caused by oxidized LDL is manganese superoxide dismutase and p53 dependent. *FASEB J.* 12, 461-467.
 86. **Kluck, R. M., Bossy-Wetzell, E., Green, D. R., Newmeyer, D. D. (1997).** The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-1136.
 87. **Kockx, M. M., Muhring, J., Bortier, H., De Meyer, G. R. Y., Jacob, W. (1996).** Biotin or digoxigenin conjugated nucleotides bind to matrix vesicles in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 94, 1771-1777.
 88. **Kockx, M. M., De Meyer, G. R. Y., Muhring, J., Jacob, W., Bult, H., Herman, A. G. (1998).** Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 97, 2307-2315.

89. **Kockx, M. M. (1998).** Apoptosis in the atherosclerotic plaques. Quantitative and qualitative aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 1519-1522.
90. **Kockx, M. M., De Meyer, G. R. Y., Buysens, N., Knaapen, M. W. M., Bult, H., Herman, A. G. (1998).** Cell composition, replication, and apoptosis in atherosclerotic plaques after 6 months of cholesterol withdrawal. *Circ. Res.* 83, 378-387.
91. **Konstadoulakis, M. M., Kymionis, G. D., Karagiani, M., Katergianakis, V., Doundoulakis, N., Pararas, V., Koutselinis, A., Sehas, M., Peveretos, P. (1998).** Evidence of apoptosis in human carotid atheroma. *J Vasc Surg* 27, 733-739.
92. **Korsmeyer, S. J., Shutter, J. R., Veis, D. J., Merry, D. E., Oltvai, Z. N. (1993).** Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 4, 327-32.
93. **Krajewska, M., Whang, H. G., Krajewski, S., Zapata, J. M., Shabaik, A., Gascoyne, R., Reed, J. C. (1997).** Immunohistochemical analyses of in vivo patterns of expression of CPP32 (caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res* 57, 1605-1613.
94. **Kroemer, G. (1997).** The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Med.* 3, 614-620.
95. **Laemmli, E. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
96. **Larsen, C. P., Alexander, D. Z., Hendrix, R., Ritchie, S. C., Pearson, A. C. (1995).** Fas-mediated cytotoxicity. An immunoeffector or immunoregulatory pathway in T cell-mediated immune responses? *Transplantation* 60, 221-224.
97. **Laufs, U., La Fata, V., Liao, J. K. (1997).** Inhibition of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase blocks hypoxia-mediated down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 272, 31725-31729.
98. **Lee, J. A. (1995).** The pathology of cardiac ischemia: cellular and molecular aspects. *J Pathol* 175, 167-174.
99. **Levine, A. J. (1997).** p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
100. **Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., Wang, X. (1997).** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/Caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.

101. **Liao, J. K., Shin, W. S., Lee, W. Y., Clark, S. L. (1995).** Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 270, 319-324.
102. **Lindahl, T., Satoh, M. S., Poirier, G. G., Klungland, A. (1995).** Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *TIBS* 20, 405-411.
103. **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, 175-184.
104. **Liu, L., Azhar, G., Gao, W., Zhang, X., Wei, J. Y. (1998).** Bcl-2 and Bax expression in adult rat hearts after coronary occlusion: age-associated differences. *Am J Physiol* 275, R315-R322.
105. **Long, X., Boluyt, M. O., de Lourdes Hipolito, M., Lundberg, M. S., Zheng, J.-S., O'Neill, L., Cirielli, C., Lakatta, E. G., Crow, M. T. (1997).** p53 and the hypoxia-induced apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J. Clin. Invest.* 99, 2635-2643.
106. **Luvara, G., Pueyo, M. E., Philippe, M., Mendet, C., Savoie, F., Henrion, D., Michel, J. B. (1998).** Chronic blockade of NO synthase activity induces a proinflammatory phenotype in the arterial wall: prevention by angiotensin II antagonism. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 18, 1408-1416.
107. **MacQuillan, L. P., Leung, G. K., Marsden, P. A., Kourembanas, S. (1994).** Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Am J Physiol* 267, H1921-H1927.
108. **Mallat, Z., Leseche, G., Tedgui, A. (1997).** Colocalization of CPP-32 with apoptotic cells in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 96, 424-428.
109. **Malyshev, I. Y., Manukhina, E. B., Mikoyan, V. D., Kubrina, L. N., Vanin, A. F. (1995).** Nitric oxide is involved in heat-induced HSP70 accumulation. *FEBS Letters* 370, 159-162.
110. **Malyshev, I. Y., Malugin, A. V., Golubeva, L. Y., Zenina, T. A., Manukhina, E. B., Mikoyan, V. D., Vanin, A. F. (1996).** Nitric oxide donors induces HSP70 accumulation in the heart and in cultured cells. *FEBS Letters* 391, 21-23.
111. **Mannick, J. B., Asano, K., Izumi, K., Kieff, E., Stamler, J. S. (1994).** Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell* 79, 1137-1146.

112. **Marber, M. S., Mestril, R., Chi, S.-H., Sayen, R., Yellon, D. M., Dillmann, W. H. (1995).** Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J. Clin. Invest.* *95*, 1446-1456.
113. **Marczin, N., Antonov, A., Papapetropoulos, A., Munn, D. H., Virmani, R., Kolodgie, F. D., Gerrity, R., Catravos, J. D. (1996).** Monocyte-induced downregulation of nitric oxide synthase in cultured aortic endothelial cells. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* *16*, 1095-10103.
114. **Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jürgensmeier, J. M., Susin, S. A., Vieira, H. L. A., Prevost, M.-C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J. C., Kroemer, G. (1998).** Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* *281*, 2027-2031.
115. **Massoudy, P., Becker, B. F., Gerlach, E. (1995).** Nitric oxide accounts for postischemic cardioprotection resulting from angiotensin-converting enzyme inhibition: direct evidence for a radical scavenger effect in isolated guinea pig heart. *J Cardiovasc Pharmacol* *25*, 440-447.
116. **Meldrum, D. R. (1998).** Tumor necrosis factor in the heart. *Am. J. Physiol.* *274*, R577-R595.
117. **Melillo, G., Taylor, L. S., Brooks, A., Musso, T., Cox, G. W., Varesio, L. (1997).** Functional requirement of the hypoxia-responsive element in the activation of the inducible nitric oxide synthase promoter by the iron chelator desferrioxamine. *J Biol Chem* *272*, 12236-12243.
118. **Michel, J. B., Feron, O., Sacks, D. Michel, T. (1997).** Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca^{2+} -Calmodulin and Caveolin. *J. Biol. Chem.* *272*, 15583-15586.
119. **Misao, J., Hayakawa, Y., Ohno, M., Kato, S., Fujiwara, T., Fujiwara, H. (1996).** Expression of Bcl-2, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulation* *94*, 1506-1512.
120. **Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Lienermann, D. A., Hoffmann, B., Reed, J. C. (1994).** Tumor suppressor p53 is a regulator of Bcl-2 and Bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* *9*, 1799-1805.
121. **Miyashita, T., Harigai, M., Hanada, M., Reed, J. C. (1994).** Identification of a p53-dependent negative response element in the Bcl-2 gene. *Cancer Res.* *54*, 3131-3135.

122. **Miyashita, T., Reed, J. C. (1995).** Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human Bax gene. *Cell* 80, 293-299.
123. **Moncada, S., Higgs, A. (1993).** The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329, 2002-2012.
124. **Morrissey, J. H. (1981).** Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem* 117, 307-310.
125. **Müller, C., Shelby, J., Weissman, I. L., Perinat-Frey, T., Eichwald, E. J. (1991).** Expression of the protease gene HF as a marker in rejecting allogeneic murine heart transplants. *Transplantation* 51, 514-517.
126. **Nagata, S. (1997).** Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.
127. **Nathan, C. (1992).** Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6, 3051-3064.
128. **Neaton, J. D., Blackburn, H., Jacobs, D., Kuller, L., Lee, D. J., Sherwin, R., Shih, J., Stamler, J., Wentworth, D. (1992).** Serum cholesterol level and mortality findings for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. *Arch. Intern. Med.* 152, 1490-1500.
129. **Nishida, K., Harrison, D. G., Navas, J. P., Dockery, S. P., Uematsu, M., Nerem, R. M., Alexander, R. W., Murphy, T. J. (1992).** Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest.* 90, 2092-2096.
130. **Nishio, E., Fukushima, K., Shiozaki, M., Watanabe, Y. (1996).** Nitric oxide donor SNAP induces apoptosis in smooth muscle cells through cGMP-independent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 221, 163-168.
131. **Node, K., Kitakaze, M., Kosaka, H., Komamura, K., Minamino, T., Inoue, M., Tada, M., Hori, M., Kamada, T. (1996).** Increased release of NO during ischemia reduces myocardial contractility and improves metabolic dysfunction. *Circulation* 93, 356-364.
132. **Nonami, Y., Rao, V., Shiono, N., Ogoshi, S. (1998).** Quenching the effects of L-Arginine on free radical injury in cultured cardiomyocytes. *Surg Today* 28, 379-384.
133. **Olivetti, G., Abbi, R., Quaini, F., Kajstura, J., Cheng, W., Nitahara, J. A., Quaini, E., Di Loreto, C., Beltrami, C. A., Krajewski, S., Reed, J. C., Anversa, P. (1997).** Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 336, 1131-1141.

134. **Pastorino, J. G., Chen, S.-T., Tafani, M., Snyder, J. W., Farber, J. L. (1998).** The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 273, 7770-7775.
135. **Paulovich, A. G., Toczyski, D. P., Hartwell, L. H. (1997).** When checkpoints fail. *Cell* 88, 315-321.
136. **Polla, B. S., Kantengwa, S., Froncois, D., Salvioli, S., Franceschi, C., Marsac, C., Cossarizza, A. (1996).** Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6458-6463.
137. **Pollman, M. J., Yamada, T., Horiuchi, M., Gibbons, G. H. (1996).** Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis - Contervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res* 79, 748-756.
138. **Pollmann, M. J., Hall, J. L., Mann, M. J., Zhang, L., Gibbons, G. H. (1998).** Inhibition of neointima cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease. *Nat Med.* 4, 222-227.
139. **Pollock, J. S., Förstermann, U., Mitchell, J. A., Warner, T. D., Harald, H. H., Schmidt, H. H. H. W., Nakane, M., Murad, F. (1991).** Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U:S:A:* 88, 10480-10484.
140. **Quinlan, T. R., Laubach, V., Zhou, N., Johns, R. A. (1998).** Alterations in nitric oxide synthase isoform expression in NOS knockout mice exposed to normoxia or hypoxia. *Chest* 114, 53S-55S.
141. **Radford, N. B., Fina, M., Benjamin, I. J., Moreadith, R. W., Graves, K. H., Zhao, P., Gavva, S., Wiethoff, A., Sherry, D., Malloy, C. R., Williams, R. S. (1996).** Cardioprotective effects of 70-kD heat shock protein in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2339-2342.
142. **Ravelli, S., Albala, A., Ming, M., Szabolcz, M., Barbone, A., Michler, R. E., Cannon, P. J. (1998).** Inducible nitric oxide synthase expression in smooth muscle cells and macrophages of human transplant coronary artery disease. *Circulation* 97, 2338-2345.
143. **Reed, J. C. (1996).** Mechanism of Bcl-2 family protein function and dysfunction in health and disease. *Behring Inst. Mitt.* 97, 72-100.
144. **Reed, J. C. (1997).** Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387, 773-776.

145. **Reid, V. C., Mitchinson, M. J., Skepper, J. N. (1993).** Cytotoxicity of oxidized low-density lipoprotein to mouse peritoneal macrophages: an ultrastructural study. *J. Pathol.* *171*, 321-328.
146. **Resnick, N., Collins, T., Atkinson, W., Bonthron, D. T., Dewey, C. F. J., Gimbrone, M. A. J. (1993).** Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* *90*, 4591-4595.
147. **Rizk, M. M., Pierzchalski, P. R., Reiss, K., Kajstura, J., Weiss, M. B., Anversa, P. (1996).** Hypoxia induces apoptosis and necrosis of adult rat ventricular myocytes in culture. *Circulation* *94*, I-471 (Abstr.).
148. **Robaye, B., Mosselmans, R., Fiers, W., Dumont, J. E., Galand, P. (1997).** Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol* *138*, 447-453.
149. **Robinson, L. J., Busconi, L., Michel, T. (1995).** Agonist-modulated palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* *270*, 995-998.
150. **Ross, R. (1993).** The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* *362*, 801-809.
151. **Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., Borner, C. (1998).** Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* *391*, 496-499.
152. **Rösl, F. (1992).** A simple and rapid method for detection of apoptosis in human cells. *Nucleic Acids Res* *20*, 5243.
153. **Rössig, L., Fichtlscherer, B., Breitschopf, K., Haendeler, J., Zeiher, A. M., Mülsch, A., Dimmeler, S. (1999).** Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J. Biol. Chem.* *274*, 6823-6826.
154. **Saraste, A., Pulkki, K., Kallajoki, M., Henriksem, K., Parvinen, M., Voipio-Pulkki, L.-M. (1997).** Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* *95*, 320-323.
155. **Savill, J., Dransfield, I., Hogg, N., Haslett, C. (1990).** Vibronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* *343*, 170-173.
156. **Schaub, M., Stadlbauer, T. H. W., Chandraker, A., Vella, J. P., Turka, L. A., Sayegh, M. H. (1998).** Comparative strategies to induce long-term graft acceptance in fully allogeneic renal versus cardiac allograft models by CD28-B7 T cell costimulatory blockade: role of thymus and spleen. *J Am Soc Nephrol* *9*, 891-898.

157. **Schendel, S. L., Xie, Z., Montal, M. O., Matsuyama, S., Montal, M. (1997).** Channel formation by anti-apoptotic protein, Bcl-2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* *94*, 5113-5118.
158. **Schmid, C., Binder, J., Heemann, U., Tilney, N. L. (1994).** Successful heterotropic heart transplantation in the rat. *Microsurgery* *15*, 279.
159. **Schulz, R., Wambolt, R. (1995).** Inhibition of nitric oxide synthesis protects the isolated working heart rabbit heart from ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* *30*, 432-439.
160. **Searle, J., Kerr, J. F. R., Bishop, C. J. (1982).** Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* *17*, 229-259.
161. **Shresta, S., Heusel, J. W., McIvor, D. M., Wesselschmidt, R. L., Russell, J. H., Ley, T. J. (1995).** Granzyme B plays a critical role in cytotoxic lymphocyte-induced apoptosis. *Immunol. Rev.* *146*, 211.
162. **Silverman, H. S., Stern, M. D. (1994).** Ionic basis of ischemic cardiac injury: insights from cellular studies. *Cardiovasc Res* *28*, 581-597.
163. **Stadlbauer, T. H. W. (1998).** Persönliche Mitteilung. .
164. **Stary, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Rosenfeld, M. E., Schwartz, C. J., Wagner, W. D., Wissler, R. W. (1995).** A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. *Circulation* *92*, 1355-1374.
165. **Suzuki, H., Wildhirt, S. M., Dudek, R. R., Narayan, K. S., Bailey, A. H., Bing, R. J. (1996).** Induction of apoptosis in myocardial infarction and its possible relationship to nitric oxide synthase in macrophages. *Tissue Cell* *28*, 89-97.
166. **Szabo, G., Bahrle, S., Batkai, S., Stumpf, N., Dengler, T. J., Zimmermann, R., Vahl, C. F., Hagl, S. (1998).** L-arginine: effect on reperfusion injury after heart transplantation. *World J Surg* *22*, 791-798.
167. **Szabolcs, M. J., Michler, R. E., Yang, X., Aji, W., Roy, D., Athan, E., Sciacca, R. R., Minanov, O. P., Cannon, P. J. (1996).** Apoptosis of cardiac myocytes during cardiac allograft rejection. Relation to induction of nitric oxide synthase. *Circulation* *94*, 1665-1673.
168. **Szabolcs, M. J., Ravalli, S., Minanov, O., Sciacca, R. R., Michler, R. E., Cannon, P. J. (1998).** Apoptosis and increased expression of inducible nitric oxide synthase in human allograft rejection. *Transplantation* *65*, 804-812.

169. **Tamatani, M., Ogawa, S., Niitsu, Y., Tohyama, M. (1998).** Involvement of Bcl-2 family and caspase-3-like protease in NO-mediated neuronal apoptosis. *J Neurochem* 71, 1588-1596.
170. **Tamatani, M., Ogawa, S., Tohyama, M. (1998).** Roles of Bcl-2 and caspases in hypoxia-induced neuronal cell death: a possible neuroprotective mechanism of peptide growth factors. *Brain Res Mol Brain Res* 58, 27-39.
171. **Tanaka, M., Hioshi, I., Susumu, A., Hajime, A., Toshio, N., Takeshi, K., Fumiaki, M., Michiaki, H. (1994).** Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger mRNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ. Res.* 75, 426-433.
172. **Thompson, C. B. (1995).** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.
173. **Togashi, H., Sasaki, M., Frohman, E., Taira, E., Ratan, R. R., Dawson, T. M., Dawson, V. L. (1997).** Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor kappa B activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 2676-2680.
174. **Weyrich, A. S., Ma, X.-l., Lefler, A. M. (1992).** The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation* 86, 279-288.
175. **Wildhirt, S. M., Dudek, R. R., Suzuki, H., Bing, R. J. (1995).** Involvement of inducible nitric oxide synthase in the inflammatory process of myocardial infarction. *Int J Cardiol* 50, 253-261.
176. **Wong, N. D., Witson, P. W., Kannel, W. B. (1991).** Serum cholesterol as a prognostic factor after myocardial infarction: the Framingham Study. *Ann. Intern. Med.* 115, 687-693.
177. **Worrall, N. K., Lazenby, W. D., Misko, T. P., Lin, T.-S., Rodi, C. P., Manning, P. T., Tilton, R. G., Ferguson, T. B. J. (1995).** Modulation of in vivo alloreactivity by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med.* 181, 63-70.
178. **Worrall, N. K., Chang, K., Suau, G. M., Allison, W. S., Misko, T. P., Sullivan, P. M., Tilton, R. G., Williamson, J. R., Ferguson, T. B. J. (1996).** Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents myocardial and systemic vascular barrier dysfunction during early cardiac allograft rejection. *Circ. Res.* 78, 769-779.
179. **Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B., Korsmeyer, S. J. (1995).** Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80, 285-91.

180. **Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T.-I., Jones, D. P., Wang, X. (1997).** Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-1132.
181. **Yang, X., Chang, H. Y., Baltimore, D. (1998).** Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* 281, 1355-1357.
182. **Yaoita, H., Ogawa, K., Maehara, K., Maruyama, Y. (1998).** Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 97, 276-281.
183. **Yasmin, W., Strynadka, K. D., Schulz, R. (1997).** Generation of peroxynitrite contributes to ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. *Cardiovasc Res* 33, 422-432.
184. **Yoshimura, S.-i., Banno, Y., Nakashima, S., Takenaka, K., Sakai, H., Nishimura, Y., Sakai, N., Shimizu, S., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., Nozawa, Y. (1998).** Ceramide formation leads to caspase-3 activation during hypoxic PC12 cell death. *J Biol Chem* 273, 6921-6927.
185. **Yoshizumi, M., Perrella, M. A., Burnett, J. C., Lee, M.-E. (1993).** Tumor necrosis factor downregulates endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ. Res.* 73, 205-209.
186. **Zeiber, A. M., Fisslthaler, B., Schray-Utz, B., Busse, R. (1995).** Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res* 76, 980-6.
187. **Zhao, Z., Francis, C. E., Welch, G., Loscalzo, J., Ravid, K. (1997).** Reduced glutathione prevents nitric oxide-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1359, 143-152.
188. **Zhu, W., Roma, P., Pellegatta, F., Catapano, M. G. (1994).** Oxidized-LDL induces the expression of heat shock protein 70 in human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200, 389-394.
189. **Zhu, W. M., Roma, P., Pirillo, A., Pellegatta, F., Catapano, A. L. (1995).** Oxidized LDL induces hsp70 expression in human smooth muscle cells. *FEBS Letters* 381, 1-5.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Weiland, Ulrike
Geb. am.: 02.10.67 in Marburg-Wehrda

Werdegang:

1974-1978 Grundschule Bromskirchen

1978-1987 Gymnasium Edertalschule in Frankenberg/E.

8/87-7/89 Ausbildung in der Ländlichen Hauswirtschaft in Bürstadt +
Lübeck,
Abschluß: Abschlußprüfung zur Hauswirtschafterin, ländlich

WS 1989/90-
WS 1994/95 Studium der Oecotrophologie, Fachrichtung Ernährungswissen-
schaften an der Justus-Liebig-Universität Gießen
Abschluß: Diplomprüfungen zur Diplom-Oecotrophologin

6/95 – 9/95 Wissenschaftliche Hilfskraft am Max-Planck-Institut für physiol.
und klinische Forschung, Kerckhoff-Institut, Bad Nauheim

01/96-15.10.99 Promotion in der Molekularen Kardiologie des Universitäts-
klinikums der J.W.-Goethe Universität Frankfurt/M.,
Abschluß: Dr. oec. troph.

seit 6/99 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Physiologischen Chemie II
der Julius-Maximilian-Universität Würzburg