

Aus dem Bereich für Innere Medizin III  
Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin  
Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. med. Michael Böhm

**Rolle der Telomerase und zellulärer Seneszenz  
beim myokardialen Remodeling nach  
experimenteller Myokardischämie in Mäusen**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2018

vorgelegt von:  
Christophe Roland Théo Arendt  
geboren am 01.05.1988  
in Esch/Alzette, Luxemburg



*Denn Zeit ist Leben. Und das Leben wohnt im Herzen.*

*Michael Ende, Momo*

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VII</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>X</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>XIV</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG / ABSTRACT</b> .....	<b>16</b>
1.1. ZUSAMMENFASSUNG .....	16
1.2. ABSTRACT .....	19
<b>2. EINLEITUNG</b> .....	<b>22</b>
2.1. BEDEUTUNG DES ALTERNS FÜR KARDIOVASKULÄRE ERKRANKUNGEN .....	22
2.2. TELOMERBIOLOGIE UND ZELLENSENESZENZ .....	23
2.2.1. Telomerkomplex .....	24
2.2.2. Endreplikationsproblem und Telomerase .....	25
2.2.3. Seneszenz .....	27
2.2.3.1. Signalwege .....	27
2.3. MYOKARDIALES REMODELING BEI ISCHÄMIE .....	29
2.3.1. Zeit- und gebietsabhängige Dynamik der pathophysiologischen Vorgänge .....	29
2.4. BEDEUTUNG DER TELOMERBIOLOGIE UND DER SENESZENZ FÜR KARDIOVASKULÄRE ERKRANKUNGEN .....	31
2.4.1. Kardiovaskuläres Zellaltern im Allgemeinen .....	31
2.4.2. Kardiovaskuläres Zellaltern im Speziellen .....	32
2.5. ZIELSETZUNG UND WISSENSCHAFTLICHE FRAGESTELLUNGEN .....	34
<b>3. MATERIAL UND METHODIK</b> .....	<b>35</b>
3.1. MATERIAL .....	35
3.1.1. Chemikalien und Reagenzien .....	35
3.1.2. Antikörper .....	37
3.1.2.1. Primärantikörper zur Immundetektion .....	37
3.1.2.2. Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper zur Immundetektion .....	38
3.1.3. Primer .....	38
3.1.3.1. Primer für RNA-basierte Real-Time PCR-Analysen .....	38
3.1.3.2. Primer für DNA-basierte Real-Time PCR-Analysen .....	39
3.1.4. Molekularbiologische Kits .....	40
3.1.5. Puffer und Lösungen .....	40
3.1.5.1. Allgemein verwendete Puffer und Lösungen .....	40
3.1.5.2. Speziell verwendete Puffer und Lösungen .....	41
3.1.6. Geräte, Zubehör und Verbrauchsmaterial .....	42
3.1.6.1. Geräte .....	42
3.1.6.2. Zubehör und Verbrauchsmaterial .....	44
3.1.7. Computersoftware .....	44
3.2. METHODIK .....	45
3.2.1. Tiermodelle .....	45
3.2.1.1. Versuchstiere und Tierhaltung .....	45
3.2.1.2. Kardiovaskuläres Schadensmodell im tierexperimentellen Versuch .....	46
3.2.1.2.1. Operationstechnik zur Induktion eines Myokardinfarkts .....	46
3.2.2. In vivo-Analysen .....	48
3.2.2.1. Magnetresonanztomographie .....	48
3.2.2.2. Intrakardiale Druckmessung .....	50
3.2.2.3. Schmerzlose Tötung der Versuchstiere und Organentnahme .....	51

3.2.3.	In vitro-Analysen .....	52
3.2.3.1.	Methoden zur Zellisolation .....	52
3.2.3.1.1.	Ficoll-basierte Dichtegradientenzentrifugation zur Isolation von MNC.....	52
3.2.3.1.1.1.	Zellzahlbestimmung .....	53
3.2.3.1.1.2.	Aufteilung der Gesamtsuspension .....	54
3.2.4.	Methoden zur Analyse von Proteinen .....	54
3.2.4.1.	Proteinisolation aus Gewebe.....	54
3.2.4.2.	Proteinisolation aus MNC.....	54
3.2.4.3.	Photometrische Konzentrationsbestimmung nach Lowry.....	55
3.2.4.4.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	55
3.2.4.5.	Proteintransfer nach dem Semi-Dry-Verfahren.....	56
3.2.4.6.	Immundetektion.....	56
3.2.4.7.	Densitometrische Quantifizierung.....	57
3.2.5.	Methoden zur Analyse von RNA .....	57
3.2.5.1.	RNA-Isolation aus Gewebe .....	57
3.2.5.2.	RNA-Isolation aus MNC .....	58
3.2.5.3.	Photometrische Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA.....	58
3.2.5.4.	Synthese komplementärer DNA aus Gewebe- und MNC-RNA .....	58
3.2.6.	Methoden zur Analyse von DNA und cDNA.....	59
3.2.6.1.	DNA-Isolation aus Gewebe und MNC.....	60
3.2.6.2.	Photometrische Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA .....	60
3.2.6.3.	Quantitative Real-Time-PCR mit interkalierendem Farbstoff.....	60
3.2.6.3.1.	Telomerlängenmessung mittels qRT-PCR .....	61
3.2.6.3.2.	Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR .....	62
3.2.6.3.3.	Auswertung.....	63
3.2.7.	Analyse der enzymatischen Aktivität der Telomerase.....	63
3.2.7.1.	CHAPS-Isolation aus Gewebe .....	63
3.2.7.2.	CHAPS-Isolation aus MNC.....	63
3.2.7.3.	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	64
3.2.7.4.	TRAP-Assay .....	64
3.2.8.	Histologische Analysen .....	66
3.2.8.1.	Paraffineinbettung und Anfertigung von Schnitten .....	66
3.2.8.2.	Sirius Red-Färbung.....	67
3.2.9.	Statistische Auswertung der Ergebnisse .....	68
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>69</b>
4.2.	STUDIENDESIGN .....	69
4.3.	FUNKTIONELLE UND MORPHOLOGISCHE ANALYSE DES HERZENS MITTELS MRT .....	70
4.4.	INTRAKARDIALE DRUCKMESSUNG.....	73
4.5.	BESTIMMUNG VON GEWICHTSINDICES.....	73
4.6.	EFFEKTE EINER MYOKARDISCHÄMIE AUF TELOMERBIOLOGIE, SENESZENZMARKER, APOPTOSEMEDIATOREN UND ZELLYKLUSREGULATOREN IN WILDTYPMÄUSEN.....	74
4.6.1.	Kardiale Signaltransduktion .....	74
4.6.1.1.	Zeit- und gebietsabhängige kardiale Regulation der Telomeraseaktivität, der Telomerlänge und der TRF2-Expression .....	74
4.6.1.2.	Zeit- und gebietsabhängige kardiale Regulation von Seneszenzmarkern, Apoptosemediatoren und Zellyklusregulatoren.....	76
4.6.2.	Extrakardiale Signaltransduktion .....	82
4.6.2.1.	Extrakardiale Regulation der Telomeraseaktivität, der Telomerlänge und der TRF2-Expression 28 Tage nach MI.....	82
4.6.2.2.	Aorta.....	82
4.6.2.3.	Leber.....	83
4.6.2.4.	MNC.....	84

4.6.2.5.	Extrakardiale Regulation von Seneszenzmarkern, Apoptosemediatoren und Zellzyklusregulatoren 28 Tage nach Myokardinfarkt.....	84
4.6.2.6.	Aorta.....	84
4.6.2.7.	Leber.....	85
4.6.2.8.	MNC.....	86
4.7.	KARDIALE UND EXTRAKARDIALE EFFEKTE AUF TELOMERBIOLOGIE, SENESZENZMARKER, APOPTOSE- UND ZELLYKLUSREGULATOREN IN TERT <sup>-/-</sup> -MÄUSEN 28 TAGE NACH MYOKARDINFARKT .....	87
4.7.1.	Effekte auf kardiale Telomerlänge und Signaltransduktion.....	87
4.7.2.	Effekte auf extrakardiale Signaltransduktion.....	90
4.7.2.1.	Extrakardiale Regulation der Signaltransduktion, Telomerlänge und telomerstabilisierender Proteine 28 Tage nach MI .....	90
4.7.2.1.1.	Aorta.....	90
4.7.2.1.2.	Leber.....	91
4.7.2.1.3.	MNC.....	92
4.7.2.2.	Extrakardiale Regulation der enzymatischen Aktivität der Seneszenzmarker, Apoptosemediatoren und Zellzyklusregulatoren 28 Tage nach MI .....	94
4.7.2.2.1.	Aorta.....	94
4.7.2.2.2.	Leber.....	95
4.7.2.2.3.	MNC.....	96
4.8.	HISTOLOGISCHE UND MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER MYOKARDFIBROSE IN TERT <sup>+/+</sup> - UND TERT <sup>-/-</sup> -MÄUSEN .....	98
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>101</b>
5.1.	KARDIALE VERÄNDERUNGEN AUF MOLEKULARER EBENE .....	101
5.2.	EXTRAKARDIALE VERÄNDERUNGEN AUF MOLEKULARER EBENE.....	104
5.3.	KARDIALE UND EXTRAKARDIALE VERÄNDERUNGEN AUF MOLEKULARER EBENE IN TERT-KNOCKOUTMÄUSEN VIER WOCHEN NACH MYOKARDINFARKT .....	105
5.4.	KARDIALE VERÄNDERUNGEN AUF HISTOLOGISCHER UND FUNKTIONELLER EBENE IN TERT <sup>-/-</sup> - UND TERT <sup>+/+</sup> -MÄUSEN .....	107
5.5.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....	109
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>111</b>
<b>7.</b>	<b>PUBLIKATIONEN / DANK .....</b>	<b>118</b>
7.1.	PUBLIKATIONEN .....	118
7.2.	DANK .....	118

**Abkürzungsverzeichnis**

ALT	<i>alternative lengthening of telomeres</i>
APS	Ammoniumpersulfat
bSSFP	<i>balanced steady-state free precession</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHAPS	Cholamidopropyldimethylammoniopropansulfonat
Chk2	<i>Cell-Cycle Checkpoint Kinase 2</i>
CT	<i>cycle treshold</i>
CTGF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dP/dtmax	maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit
dP/dtmin	maximale Druckabfallsgeschwindigkeit
DTT	Dithiothreitol
EDD	enddiastolischer Diameter
EDP	enddiastolischer Druck
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDV	enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiografie
ESD	endsystolischer Diameter
ESV	endsystolisches Volumen
FKS	fetales Kälberserum
fwd	<i>forward</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

---

GLB1	β-Galaktosidase
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HZV	Herzzeitvolumen
Ig	Immunglobulin
IZ	Infarktzone
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KHK	koronare Herzkrankheit
KI	kardialer Index
LAD	<i>left anterior descending</i>
LDL	<i>Low Density</i> Lipoprotein
LV	linker Ventrikel / linksventrikulär
M	Masse
MI	Myokardinfarkt / Myokardischämie
MNC	mononukleäre Zellen
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomografie
NTC	<i>no template control</i>
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time</i> Polymerase-Kettenreaktion
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rT	relative Transkription



---

RZ	Randzone
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SIRT1	Sirtuin-1
SV	Schlagvolumen
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TERC	<i>telomerase RNA content</i>
TERT	Telomerase-Reverse-Transkriptase
TRAP	<i>Telomere-Repeat Amplification Protocol</i>
TRF2	<i>telomeric repeat-binding factor 2</i>
TRIS	Tris-aminomethan
VW	Vorderwand
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp

## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES TELOMERKOMPLEXES, IN ANLEHNUNG AN CALADO ET AL. [47]. .....	25
ABBILDUNG 2: ZUR SICHERUNG DER ATEMWEGE WURDEN DIE NARKOTISIERTEN MÄUSE UNTER SICHT AUF DIE GEÖFFNETE STIMMRITZE OROTRACHEAL INTUBIERT (A). NACH DEM LINKS PARASTERNALEM HAUTSCHNITT WURDEN DIE MUSCULI PECTORALES STUMPF DURCHTRENNT (B), UM SICH ÜBER DEN 3. INTERKOSTALRAUM EINEN ZUGANG ZUR LAD ZU VERSCHAFFEN. MITTELS FADENSCHLINGE WURDE DAS VORDERWANDMYOKARD PROXIMAL DES LINKEN VORHOFOHRS DURCHSTOCHEN (C) UND DIE LAD MITTELS KNOTEN PERMANENT LIGIERT (D). LAD: LEFT ANTERIOR DESCENDING. ....	48
ABBILDUNG 3: PARAKORONARER LÄNGSACHSENBLICK (A) UND MITTVENTRIKULÄRE KURZACHSENBLICKE (B,C) IN BSSFP-SEQUENZ (BRIGHT BLOOD) EINER SCHEINOPERIERTEN WILDTYPMAUS MIT SEMIAUTOMATISCHER FUNKTIONSANALYSE DURCH KONTURIERUNG DES ENDO- (ROT) UND EPIKARDS (GRÜN) IN ENDDIASTOLE (B) UND ENDSYSTOLE (C). BSSFP: BALANCED STEADY-STATE FREE PRECESSION. ....	49
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PHASENTRENNUNG NACH DICTEGRADIENTENZENTRIFUGATION MITTELS FICOLL-TRENNLÖSUNG ZUR ISOLATION VON MNC. MNC: MONONUKLEÄRE ZELLEN. ....	53
ABBILDUNG 5: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINER 12-PUNKT-STANDARDKURVE EINER VERDÜNNUNGSREIHE VON 2 – 2.000 HEK-ZELLEN IN EINEM TRAP-ASSAY MIT CHAPS BUFFER ALS NEGATIVE KONTROLLE. CHAPS: CHOLAMIDOPROPYLDIMETHYL-AMMONIOPROPANSULFONAT HEK: HUMAN EMBRYONIC KIDNEY; TRAP: TELOMERE-REPEAT AMPLIFICATION PROTOCOL.....	65
ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES STUDIENDESIGNS DER INITIALEN GRUPPE ZUR UNTERSUCHUNG EINER MÖGLICHEN ZEITLICHEN DYNAMIK VON REGULATIONSMECHANISMEN 3, 7 UND 28 TAGE NACH MI IN WT-MÄUSEN. MI: MYOKARDINFARKT; WT: WILDTYP .....	70
ABBILDUNG 7: MITTVENTRIKULÄRE KURZACHSENBLICKE IN ENDDIASTOLE (A, B) UND ENDSYSTOLE (C, D) SOWIE LÄNGSACHSENBLICKE (E, F) IN ENDDIASTOLE, DARGESTELLT MITTELS BSSFP-SEQUENZ IM KARDIO-MRT. STRUKTURELL UNAUFFÄLLIGE DARSTELLUNG DES MYOKARDS IN EINEM KONTROLLTIERT OHNE INFARKT (A, C, E). IN DER INFARKTMAUS FINDET SICH HINGEGEN MITTVENTRIKULÄR ANTERIOR-ANTEROSEPTAL (B, D) UND MITTVENTRIKULÄR-APIKAL ANTEROSEPTAL (F) EINE HOCHGRADIGE MYOKARDAUSDÜNNUNG DES MYOKARDS, VEREINBAR MIT EINEM TRANSMURALINFARKT IM LAD-STROMGEBIET. IM CINE-MODUS WEISEN DIE INFARZIERTEN SEGMENTE EINE AKINESIE MIT GLOBAL LEICHT REDUZIERTER SYSTOLISCHER FUNKTION AUF. BSSFP: BALANCED STEADY-STATE FREE PRECESSION; LAD: LEFT ANTERIOR DESCENDING; MRT: MAGNETRESONANZTOMOGRAPHIE.....	72
ABBILDUNG 8: DARSTELLUNG DER MYOKARDIALEN TELOMERASEAKTIVITÄT IM ZEITLICHEN VERLAUF 3, 7 UND 28 TAGE NACH MI IN WT-MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM RZ (T-TEST); #P<0,05 vs. TAG 3 (SELBE REGION)(ANOVA DER 3 ZEITPUNKTE INNERHALB DER REGION). IZ: INFARKTZONE; MI: MYOKARDINFARKT; RZ: RANDZONE; VW: VORDERWAND; WT: WILDTYP.....	75

ABBILDUNG 9: DARSTELLUNG DER MYOKARDIALEN TELOMERLÄNGE 4 WOCHEN NACH MI IN WT-MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM RZ (ANOVA). IZ: INFARKTZONE; MI: MYOKARDINFARKT; RZ: RANDZONE; VW: VORDERWAND; WT: WILD TYP. ....	76
ABBILDUNG 10: DARSTELLUNG DER MYOKARDIALEN TRF2-PROTEINEXPRESSION IM ZEITLICHEN VERLAUF 3, 7 UND 28 TAGE NACH MI IN WT-MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM RZ (T-TEST); #P<0,05 vs. TAG 3 (SELBE REGION) (ANOVA DER 3 ZEITPUNKTE INNERHALB DER REGION). IZ: INFARKTZONE; MI: MYOKARDINFARKT; RZ: RANDZONE; VW: VORDERWAND; WT: WILD TYP. ....	76
ABBILDUNG 11: DARSTELLUNG DER MYOKARDIALEN P53-PROTEINEXPRESSION IM ZEITLICHEN VERLAUF 3, 7 UND 28 TAGE NACH MI IN WT-MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM RZ (T-TEST); #P<0,05 vs. TAG 3 (SELBE REGION) (ANOVA DER 3 ZEITPUNKTE INNERHALB DER REGION). MI: MYOKARDINFARKT; RZ: RANDZONE; VW: VORDERWAND; WT: WILD TYP. ....	78
ABBILDUNG 12: DARSTELLUNG DER MYOKARDIALEN CHK2-PROTEINEXPRESSION IM ZEITLICHEN VERLAUF 3, 7 UND 28 TAGE NACH MI IN WT-MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM RZ (T-TEST); #P<0,05 vs. TAG 3 (SELBE REGION) (ANOVA DER 3 ZEITPUNKTE INNERHALB DER REGION). MI: MYOKARDINFARKT; RZ: RANDZONE; VW: VORDERWAND; WT: WILD TYP. ....	78
ABBILDUNG 13. DARSTELLUNG DER MYOKARDIALEN BAX-PROTEINEXPRESSION IM ZEITLICHEN VERLAUF 3, 7 UND 28 TAGE NACH MI IN WT-MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM RZ (T-TEST); #P<0,05 vs. TAG 3 (SELBE REGION) (ANOVA DER 3 ZEITPUNKTE INNERHALB DER REGION). MI: MYOKARDINFARKT; RZ: RANDZONE; VW: VORDERWAND; WT: WILD TYP. ....	79
ABBILDUNG 14: DARSTELLUNG DER MYOKARDIALEN PAKT-PROTEINEXPRESSION IM ZEITLICHEN VERLAUF 3, 7 UND 28 TAGE NACH MI IN WT-MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM RZ (T-TEST); #P<0,05 vs. TAG 3 (SELBE REGION) (ANOVA DER 3 ZEITPUNKTE INNERHALB DER REGION). MI: MYOKARDINFARKT; RZ: RANDZONE; VW: VORDERWAND; WT: WILD TYP. ....	79
ABBILDUNG 15: DARSTELLUNG DER MYOKARDIALEN P16-PROTEINEXPRESSION IM ZEITLICHEN VERLAUF 3, 7 UND 28 TAGE NACH MI IN WT-MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM RZ (T-TEST); #P<0,05 vs. TAG 3 (SELBE REGION) (ANOVA DER 3 ZEITPUNKTE INNERHALB DER REGION). MI: MYOKARDINFARKT; RZ: RANDZONE; VW: VORDERWAND; WT: WILD TYP. ....	80
ABBILDUNG 16: DARSTELLUNG DER MYOKARDIALEN P16-GENEXPRESSION 4 WOCHEN NACH MI IN WT- MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM RZ (ANOVA). MI: MYOKARDINFARKT; RZ: RANDZONE; WT: WILD TYP. ...	80
ABBILDUNG 17: DARSTELLUNG DER MYOKARDIALEN GLB1-PROTEINEXPRESSION 4 WOCHEN NACH MI IN WT- MÄUSEN. MI: MYOKARDINFARKT; RZ: RANDZONE;; WT: WILD TYP. ....	81
ABBILDUNG 18: DARSTELLUNG DER MYOKARDIALEN GLB1-GENEXPRESSION 4 WOCHEN NACH MI IN WT- MÄUSEN. MI: MYOKARDINFARKT; WT: WILD TYP. ....	81
ABBILDUNG 19: DARSTELLUNG DER MYOKARDIALEN SIRT1-PROTEINEXPRESSION 4 WOCHEN NACH MI IN WT- MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM RZ (ANOVA). MI: MYOKARDINFARKT; RZ: RANDZONE; WT: WILD TYP. ...	82
ABBILDUNG 20: DARSTELLUNG DER AORTALEN TELOMERASEAKTIVITÄT, TELOMERLÄNGE UND TRF2- PROTEINEXPRESSION 4 WOCHEN NACH MI IN WT-MÄUSEN. MI: MYOKARDINFARKT; WT: WILD TYP. ....	83
ABBILDUNG 21: DARSTELLUNG DER HEPATISCHEN TELOMERASEAKTIVITÄT, TELOMERLÄNGE, TRF2- PROTEINEXPRESSION UND TRF2-GENEXPRESSION 4 WOCHEN NACH MI IN WT-MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM (T-TEST). MI: MYOKARDINFARKT; WT: WILD TYP. ....	83

ABBILDUNG 22: DARSTELLUNG DER TELOMERASEAKTIVITÄT, TELOMERLÄNGE UND TRF2- PROTEINEXPRESSION IN MNC 4 WOCHEN NACH MI IN WT-MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM (T-TEST). MI: MYOKARDINFARKT; MNC: MONONUKLEÄRE ZELLEN; WT: WILD TYP. ....	84
ABBILDUNG 23: DARSTELLUNG DER AORTALEN P53- UND P16-PROTEINEXPRESSION 4 WOCHEN NACH MI IN WT-MÄUSEN. MI: MYOKARDINFARKT; WT: WILD TYP. ....	85
ABBILDUNG 24: DARSTELLUNG DER HEPATISCHEN PROTEINEXPRESSION VON P53, CHK2, BAX, PAKT, P16 UND SIRT1 SOWIE DER HEPATISCHEN GENEXPRESSION VON SIRT1 4 WOCHEN NACH MI IN WT-MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM (T-TEST). MI: MYOKARDINFARKT; WT: WILD TYP. ....	86
ABBILDUNG 25: DARSTELLUNG DER P53- UND P16-PROTEINEXPRESSION IN MNC 4 WOCHEN NACH MI IN WT- MÄUSEN. MI: MYOKARDINFARKT; MNC: MONONUKLEÄRE ZELLEN; WT: WILD TYP. ....	86
ABBILDUNG 26: DARSTELLUNG DER MYOKARDIALEN TELOMERLÄNGE UND TRF2-PROTEINEXPRESSION 4 WOCHEN NACH MI IN TERT <sup>-/-</sup> -MÄUSEN. IZ: INFARKTZONE; MI: MYOKARDINFARKT; RZ: RANDZONE; TERT: TELOMERASE-REVERSE-TRANSKRIPTASE; VW: VORDERWAND. ....	87
ABBILDUNG 27: DARSTELLUNG DER MYOKARDIALEN TELOMERLÄNGE UND TRF2-PROTEINEXPRESSION 4 WOCHEN NACH MI IN TERT <sup>+/-</sup> UND TERT <sup>-/-</sup> -MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM TERT <sup>+/+</sup> (ANOVA). TERT: TELOMERASE-REVERSE-TRANSKRIPTASE. ....	88
ABBILDUNG 28: DARSTELLUNG DER MYOKARDIALEN P53-, CHK2, BAX-, PAKT-, UND P16-PROTEINEXPRESSION 4 WOCHEN NACH MI IN TERT <sup>-/-</sup> -MÄUSEN. *P<0,05 vs. RZ (ANOVA). IZ: INFARKTZONE; MI: MYOKARDINFARKT; RZ: RANDZONE; TERT: TELOMERASE-REVERSE-TRANSKRIPTASE; VW: VORDERWAND. ....	89
ABBILDUNG 29: DARSTELLUNG DER MYOKARDIALEN P53-, CHK2, BAX-, PAKT-, UND P16-PROTEINEXPRESSION 4 WOCHEN NACH MI IN TERT <sup>+/-</sup> UND TERT <sup>-/-</sup> -MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM TERT <sup>+/+</sup> (ANOVA). IZ: INFARKTZONE; MI: MYOKARDINFARKT; RZ: RANDZONE; TERT: TELOMERASE-REVERSE- TRANSKRIPTASE; VW: VORDERWAND. ....	89
ABBILDUNG 30: DARSTELLUNG DER AORTALEN TRF2-PROTEINEXPRESSION 4 WOCHEN NACH MI IN TERT <sup>-/-</sup> - MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM TERT <sup>+/+</sup> (ANOVA). MI: MYOKARDINFARKT; TERT: TELOMERASE- REVERSE-TRANSKRIPTASE. ....	90
ABBILDUNG 31: DARSTELLUNG DER AORTALEN TRF2-PROTEINEXPRESSION 4 WOCHEN NACH MI DER TERT <sup>-/-</sup> - MÄUSE IM VERGLEICH ZU TERT <sup>+/-</sup> -MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM TERT <sup>+/+</sup> (ANOVA). MI: MYOKARDINFARKT; TERT: TELOMERASE-REVERSE-TRANSKRIPTASE. ....	91
ABBILDUNG 32: DARSTELLUNG DER HEPATISCHEN TELOMERLÄNGE UND TRF2-PROTEINEXPRESSION 4 WOCHEN NACH MI IN TERT <sup>-/-</sup> -MÄUSEN. MI: MYOKARDINFARKT; TERT: TELOMERASE-REVERSE- TRANSKRIPTASE. ....	92
ABBILDUNG 33: DARSTELLUNG DER HEPATISCHEN TELOMERLÄNGE UND TRF2-PROTEINEXPRESSION 4 WOCHEN NACH MI IN TERT <sup>+/-</sup> UND TERT <sup>-/-</sup> -MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM TERT <sup>+/+</sup> (ANOVA). MI: MYOKARDINFARKT; TERT: TELOMERASE-REVERSE-TRANSKRIPTASE. ....	92
ABBILDUNG 34: DARSTELLUNG DER TELOMERLÄNGE UND TRF2-PROTEINEXPRESSION IN MNC 4 WOCHEN NACH MI IN TERT <sup>-/-</sup> -MÄUSEN. MI: MYOKARDINFARKT; MNC: MONONUKLEÄRE ZELLEN; TERT: TELOMERASE-REVERSE-TRANSKRIPTASE. ....	93

ABBILDUNG 35: DARSTELLUNG DER TELOMERLÄNGE UND TRF2-PROTEINEXPRESSION IN MNC 4 WOCHEN NACH MI IN TERT <sup>+/+</sup> -UND TERT <sup>-/-</sup> -MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM TERT <sup>+/+</sup> (ANOVA). MI: MYOKARDINFARKT; MNC: MONONUKLEÄRE ZELLEN; TERT: TELOMERASE-REVERSE-TRANSKRIPTASE. ....	93
ABBILDUNG 36: DARSTELLUNG DER AORTALEN P53- UND P16-PROTEINEXPRESSION 4 WOCHEN NACH MI IN TERT <sup>-/-</sup> -MÄUSEN. MI: MYOKARDINFARKT; TERT: TELOMERASE-REVERSE-TRANSKRIPTASE. ....	94
ABBILDUNG 37: DARSTELLUNG DER AORTALEN P53- UND P16-PROTEINEXPRESSION 4 WOCHEN NACH MI IN TERT <sup>+/+</sup> - UND TERT <sup>-/-</sup> -MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM TERT <sup>+/+</sup> (ANOVA). MI: MYOKARDINFARKT; TERT: TELOMERASE-REVERSE-TRANSKRIPTASE. ....	95
ABBILDUNG 38: DARSTELLUNG DER HEPATISCHEN P53-, CHK2-, BAX-, PAKT-, P16-, SIRT1-PROTEINEXPRESSION 4 WOCHEN NACH MI IN TERT <sup>-/-</sup> -MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM TERT <sup>+/+</sup> (T-TEST). MI: MYOKARDINFARKT; TERT: TELOMERASE-REVERSE-TRANSKRIPTASE. ....	96
ABBILDUNG 39: DARSTELLUNG DER HEPATISCHEN P53-, CHK2-, BAX-, PAKT-, P16-, SIRT1-PROTEINEXPRESSION 4 WOCHEN NACH MI IN TERT <sup>+/+</sup> - UND TERT <sup>-/-</sup> -MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM TERT <sup>+/+</sup> (ANOVA). MI: MYOKARDINFARKT; TERT: TELOMERASE-REVERSE-TRANSKRIPTASE. ....	96
ABBILDUNG 40: DARSTELLUNG P53- UND P16-PROTEINEXPRESSION IM MNC 4 WOCHEN NACH MI IN TERT <sup>-/-</sup> -MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM (T-TEST). MI: MYOKARDINFARKT; MNC: MONONUKLEÄRE ZELLEN; TERT: TELOMERASE-REVERSE-TRANSKRIPTASE. ....	97
ABBILDUNG 41: DARSTELLUNG P53- UND P16-PROTEINEXPRESSION IM MNC 4 WOCHEN NACH MI IN TERT <sup>+/+</sup> - UND TERT <sup>-/-</sup> -MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM TERT <sup>+/+</sup> (ANOVA). MI: MYOKARDINFARKT; MNC: MONONUKLEÄRE ZELLEN; TERT: TELOMERASE-REVERSE-TRANSKRIPTASE. ....	97
ABBILDUNG 42: ABBILDUNG EINES MITTMYOKARDIALEN SCHNITTES NACH SIRIUS RED-FÄRBUNG IN EINER TERT <sup>+/+</sup> - (LINKS) UND TERT <sup>-/-</sup> -MAUS (RECHTS) 4 WOCHEN NACH MI. MI: MYOKARDINFARKT; TERT: TELOMERASE-REVERSE-TRANSKRIPTASE. ....	98
ABBILDUNG 43: DARSTELLUNG DER PROZENTUALEN MYOKARDIALEN FIBROSE 4 WOCHEN NACH MI IN TERT <sup>+/+</sup> - UND TERT <sup>-/-</sup> -MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM TERT <sup>+/+</sup> (ANOVA). #P<0,05 vs. SHAM TERT <sup>-/-</sup> (ANOVA). MI: MYOKARDINFARKT; TERT: TELOMERASE-REVERSE-TRANSKRIPTASE. ....	99
ABBILDUNG 44: DARSTELLUNG DER MYOKARDIALEN FIBROSE 4 WOCHEN NACH MI IN TERT <sup>-/-</sup> -MÄUSEN IM VERGLEICH ZU TERT <sup>+/+</sup> -INFARKTMÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM TERT <sup>+/+</sup> (T-TEST). MI: MYOKARDINFARKT; TERT: TELOMERASE-REVERSE-TRANSKRIPTASE. ....	99
ABBILDUNG 45: DARSTELLUNG DER MYOKARDIALEN COLLAGEN-1A-MRNA-EXPRESSION 4 WOCHEN NACH MI IN TERT <sup>+/+</sup> - UND TERT <sup>-/-</sup> -MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM TERT <sup>+/+</sup> (ANOVA). #P<0,05 vs. SHAM TERT <sup>-/-</sup> (ANOVA). MI: MYOKARDINFARKT; mRNA: MESSENGER RIBONUKLEINSÄURE; TERT: TELOMERASE-REVERSE-TRANSKRIPTASE. ....	100
ABBILDUNG 46: DARSTELLUNG DER MYOKARDIALEN CTGF-MRNA-EXPRESSION 4 WOCHEN NACH MI IN TERT <sup>+/+</sup> - UND TERT <sup>-/-</sup> -MÄUSEN. *P<0,05 vs. SHAM TERT <sup>+/+</sup> (ANOVA). #P<0,05 vs. SHAM TERT <sup>-/-</sup> (ANOVA). CTGF: CONNECTIVE TISSUE GROWTH FACTOR; MI: MYOKARDINFARKT; mRNA: MESSENGER RIBONUKLEINSÄURE; TERT: TELOMERASE-REVERSE-TRANSKRIPTASE. ....	100

## Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: VERWENDETE CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN.....	37
TABELLE 2: PRIMÄRANTIKÖRPER ZUR IMMUNDETEKTION. ZU DETEKTIERENDE PROTEINE MIT ANGABE IHRES MOLEKULARGEWICHTS, VERWENDETE ANTIKÖRPER, HERSTELLER, SPEZIES, VERDÜNNUNG IN 1XPBS-TWEEN.....	38
TABELLE 3: PEROXIDASE-GEKOPPELTE SEKUNDÄRANTIKÖRPER ZUR IMMUNDETEKTION. SPEZIES, ANTIKÖRPER, HERSTELLER, VERDÜNNUNG IN 1XPBS-TWEEN.....	38
TABELLE 4: PRIMER FÜR RNA-BASIERTE REAL-TIME PCR-ANALYSEN. BASENABFOLGE DER FORWARD (FWD)- UND REVERSE (REV)-PRIMER, ANNEALING-TEMPERATUR 60°C, 40 PCR-ZYKLEN.....	39
TABELLE 5: PRIMER FÜR DNA-BASIERTE REAL-TIME PCR-ANALYSEN. BASENABFOLGE DER FORWARD (FWD)- UND REVERSE (REV)-PRIMER.....	40
TABELLE 6: MOLEKULARBIOLOGISCHE KITS . PRODUKT, HERSTELLER.....	40
TABELLE 7: VERWENDETE LABORGERÄTE. PRODUKT, HERSTELLER. ....	44
TABELLE 8: VERWENDETES ZUBEHÖR UND VERBRAUCHSMATERIAL. PRODUKT, HERSTELLER. ....	44
TABELLE 9: VERWENDETE COMPUTERSOFTWARE. PRODUKT, HERSTELLER.....	45
TABELLE 10: ZUSAMMENSETZUNG DES POLYACRYLAMIDGELS. GELKOMPONENTE, 10%IGES TRENNGEL FÜR TRF2, CHK2, AKT, PAKT, P53 UND GAPDH, 12%IGES TRENNGEL FÜR P16, BAX UND BCL2, 5%IGES SAMMELGEL.....	55
TABELLE 11: ZUSAMMENSETZUNG DES MASTERMIX ZUR CDNA-SYNTHESE. KOMPONENTE UND VOLUMEN PRO ANSATZ.....	59
TABELLE 12: PROTOKOLL ZUR CDNA-SYNTHESE. INKUBATIONSZEIT UND TEMPERATUR. ....	59
TABELLE 13: ZUSAMMENSETZUNG DES MASTERMIX FÜR QRT-PCR-ANALYSEN ZUR TELOMERLÄNGENMESSUNG. KOMPONENTE, VOLUMEN PRO PROBE FÜR TELO2, VOLUMEN PRO PROBE FÜR 36B4.....	61
TABELLE 14: ETABLIERTES PCR-PROGRAMM ZUR AMPLIFIKATION DER .....	62
TABELLE 15: ZUSAMMENSETZUNG DES MASTERMIX FÜR QRT-PCR-ANALYSEN ZUR GENEXPRESSIONSANALYSE. KOMPONENTE, VOLUMEN PRO PROBE FÜR DIE JEWEILIGE TARGET- UND DIE 18S-RRNA.....	62
TABELLE 16: AUTOMATISCHES PROGRAMM ZUR PARAFFINEINBETTUNG IM.....	66
TABELLE 17: FÄRBEPROTOKOLL ZUR SIRIUS RED-FÄRBUNG VON PARAFFINSCHNITTEN INKUBATIONSMEDIUM, INKUBATIONSZEIT .....	67
TABELLE 18: TEICHHOLZAUSWERTUNG DES KARDIO-MRT 27 TAGE NACH MI IN TERT <sup>+/+</sup> - UND TERT <sup>-/-</sup> -MÄUSEN (MITTELWERT ± SEM). *P<0,05 vs. SHAM <sup>+/+</sup> (T-TEST); #P<0,05 vs. SHAM <sup>-/-</sup> (T-TEST). EDD: ENDDIASTOLISCHER DIAMETER; EDV: ENDDIASTOLISCHES VOLUMEN; EF: EJEKTIONSFRAKTION; LV: LINKER VENTRIKEL; MI: MYOKARDINFARKT; MRT: MAGNETRESONANZTOMOGRAFIE; SV: SCHLAGVOLUMEN; TERT: TELOMERASE-REVERSE-TRANSKRIPTASE.....	71
TABELLE 19: KONTURAUSWERTUNG DES KARDIO-MRT 27 TAGE NACH MI IN TERT <sup>+/+</sup> - UND TERT <sup>-/-</sup> -MÄUSEN (MITTELWERT ± SEM). *P<0,05 vs. SHAM <sup>+/+</sup> (T-TEST); #P<0,05 vs. SHAM <sup>-/-</sup> (T-TEST). KI: KARDIALER	

---

INDEX; EDV: ENDDIASTOLISCHES VOLUMEN; EF: EJEKTIONSFRAKTION; LV: LINKER VENTRIKEL; M: MASSE; MI: MYOKARDINFARKT; MRT: MAGNETRESONANZTOMOGRAFIE; TERT: TELOMERASE-REVERSE-TRANSKRIPTASE.....	71
TABELLE 20: DARSTELLUNG DER MESSERGEBNISSE DER INVASIVEN INTRAKARDIALEN DRUCKMESSUNG MITTELS MILLAR-KATHETER 4 WOCHEN NACH MI IN TERT <sup>+/+</sup> - UND TERT <sup>-/-</sup> -MÄUSEN (MITTELWERT ± SEM, N=3-4). DP/DTMAX; MAXIMALE DRUCKANSTIEGSGESCHWINDIGKEIT; DP/DTMIN: MAXIMALE DRUCKABFALLSGESCHWINDIGKEIT; HF: HERZFREQUENZ; LVEDP; LINKSVENTRIKULÄRER ENDDIASTOLISCHER DRUCK; MI: MYOKARDINFARKT; TERT: TELOMERASE-REVERSE-TRANSKRIPTASE. ....	73
TABELLE 21: KÖRPERGEWICHT UND ORGANGEWICHTSINDICES 4 WOCHEN NACH MI IN TERT <sup>+/+</sup> - UND TERT <sup>-/-</sup> -MÄUSEN (MITTELWERT ± SEM). MI: MYOKARDINFARKT; TERT: TELOMERASE-REVERSE-TRANSKRIPTASE.....	74

# 1. Zusammenfassung / Abstract

## 1.1. Zusammenfassung

Die Zellalterung könnte für das so genannte myokardiale Remodeling, also einen Anpassungsprozess des Herzmuskels nach kardialer Schädigung, eine wichtige Rolle spielen. Die komplexe Regulation von Vorgängen wie Zellüberleben / Apoptose, Zellproliferation, Fibrose und Seneszenz betreffen nicht nur die primär von dem kardialen Schaden betroffenen Zellen des Myokards, sondern involvieren auch Einwanderung und Überleben von extrakardialen Zellen wie Entzündungszellen mit dem Ziel der Heilung, Narbenbildung und Regeneration. Telomere und telomer-regulierende Proteine wie Telomerase und *telomeric repeat-binding factor 2* (TRF2) sind nicht nur für die Steuerung und Kontrolle der Zellalterung wichtig, sondern interagieren bekanntermaßen mit allen o.g. Vorgängen. Durch das Modell der experimentellen Myokardischämie (MI) mittels Ligatur der proximalen *left anterior descending* (LAD) *artery* in Mäusen ist es möglich, diese bislang wenig erforschten Mechanismen der Zellalterung nach einem Herzinfarkt besser zu verstehen. Dies war das Hauptziel der vorliegenden Promotionsarbeit, in der, neben der Erforschung der kardialen Regulation der Telomerparameter bei genetisch unveränderten Tieren, die kausale Rolle der Telomerase sowohl für das myokardiale Remodeling als auch für die Regulation in extrakardialen Organen in Knockout-Mäusen untersucht wurde.

Zunächst wurde der Frage nachgegangen, ob es eine zeitlich (Tag 3, 7 und 28) und regional (Infarkt- (IZ) und Randzone (RZ)) unterschiedliche Regulation der Telomerlänge, Telomerase und telomer-assoziiierter Proteine nach Induktion eines MI durch proximale LAD-Ligatur gibt. In männlichen, 10-14 Wochen alten C57Bl/6N-Wildtypmäusen (WT) konnten wir mit Hilfe des *Telomere-Repeat Amplification Protocol* (TRAP)-Assays zeigen, dass initial bloß in der IZ und nicht in der RZ eine signifikante Steigerung der Telomeraseaktivität vorlag. An Tag 7 nach Operation fand sich dann eine weitere Zunahme, wobei dieser Effekt an Tag 28 nur in der IZ noch stärker ausgeprägt war. Die Telomerlänge wurde nach 4 Wochen bestimmt und war in der RZ mehr als in der IZ verlängert. Parallel zur Telomeraseaktivität beobachteten wir gleichzeitig eine Aktivierung anti-seneszenter / anti-apoptotischer (TRF2, pAKT) und



pro-seneszenter / pro-apoptotischer (p53, *Cell-Cycle Checkpoint Kinase 2* (Chk2), Bax, p16) Signalwege. Diese schien zeitlich begrenzt zu sein mit einem Maximum an Tag 7 nach MI, und sich nach 4 Wochen eine Gegenregulation unter den Ausgangswert (TRF2, p53, Chk2, pAkt) bzw. Rückkehr zur Baseline (Bax) fand. Sirtuin-1 (SIRT1) und p16 hingegen waren beide an Tag 28 nach MI noch deutlich hochreguliert.

Des Weiteren wurden drei extrakardiale Organsysteme untersucht: 1.) die Aorta ascendens, weil sich im Rahmen der kardialen Funktionsverschlechterung nach MI durch geänderte Scherkräfte in den zentralen Gefäßen eine zelluläre Regulation ergeben könnte. Die Assays lieferten insgesamt kein valides Ergebnis. 2.) Die Leber, weil dieses Organ zum einen empfindlich auf einen kardialen Rückstau ist, zum anderen eines der hämatopoetischen Organe der Maus und somit Quelle für inflammatorische Zellen und Stammzellen, welche vom Herzen nach einer Ischämie durch Chemokine angelockt werden, ist. Die wichtigsten Befunde waren eine reduzierte Telomeraseaktivität und eine gleichzeitig erhöhte Expression von Bax und SIRT1 in den Infarkttieren. 3.) Die mononukleären Zellen (MNC) der Milz, da sie ebenfalls ein hämatopoetisches Organ in der Maus ist und über die zirkulierenden Zellen an der Infarktheilung teilnimmt. Die Ergebnisse in der heterogenen Population der MNC streuten, ähnlich wie in der Aorta, stark. Es zeigte sich allerdings konsistent eine gesteigerte Telomerlänge nach 4 Wochen, hinweisend auf eine Ausschwemmung von Stammzellen mit langen Telomeren aus dem blutbildenden System.

Zusätzlich wurden weibliche, 11-34 Wochen alte Mäuse der 2. Generation (d.h. mit noch nicht verkürzten Telomeren) mit globaler genetischer Defizienz der Telomerase-Reverse-Transkriptase (TERT), der katalytischen Untereinheit der Telomerase, an Tag 28 nach Scheinoperation bzw. MI untersucht. Im Vergleich zu den C57Bl/6N- und den TERT<sup>+/+</sup>-Tieren zeigten die Infarktmäuse ohne Telomeraseaktivität zum Teil deutliche Unterschiede in der Regulation. Die Telomerlänge und TRF2-Expression waren z.B. in TERT<sup>-/-</sup>-Infarktmäusen nicht verändert, jedoch waren bereits in der TERT<sup>-/-</sup>- im Vgl. zur TERT<sup>+/+</sup>-Shamgruppe die pro-apoptotischen Proteine p53 und Bax vermindert und der Seneszenzmarker p16 erhöht, was durch den Infarkt nicht weiter beeinflusst wurde. In histologischen Untersuchungen zeigte sich ebenfalls ein entscheidender Unterschied bei den TERT-defizienten MI-Tieren gegenüber den TERT-positiven Kontrollen: auffällig war eine deutlich vermehrte Myokardfibrose in der *Sirius Red*-Färbung. Dieser wichtige Befund konnte durch den Nachweis einer gesteigerten Genexpression von

*Collagen-1 $\alpha$*  und *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF) molekularbiologisch noch untermauern werden. Die oben genannten Veränderungen der Proteinexpression könnten eine Erklärung für den möglichen Einfluss der TERT-Defizienz auf die Kollagenakkumulation sein. Die Untersuchungen in extrakardialen Geweben führten, ähnlich wie bei den C57Bl/6N-Tieren, zu heterogenen Ergebnissen im Myokard, wiesen aber insgesamt auf eine Störung der extrakardialen Regulation des kardialen Remodeling, z.B. durch fehlenden Nachweis von MNC mit längeren Telomeren bei TERT<sup>-/-</sup>-Infarkttieren hin, während andere Regulationen vergleichbar waren.

Eine weitere Fragestellung der Arbeit betraf die funktionellen Konsequenzen der TERT-Defizienz im Kontext des MI. Die Messung der Indices von Herzgewicht / Tibiallänge bzw. / Körpergewicht (KG), Lungenfeuchtgewicht / KG und Leberfeuchtgewicht / KG zeigte, dass 4 Wochen nach LAD-Ligatur weder eine Myokardhypertrophie noch eine Herzinsuffizienz vorlagen. Die Kardio-Magnetresonanztomografie (MRT) und der Millar-Katheter verifizierten zwar die kardiale Funktionsminderung mit erniedrigter Pump- bzw. Druckleistung durch den operativ induzierten MI, eindeutige genotypische Unterschiede waren jedoch nicht zu verzeichnen. Dies ist auf den kurzen Zeitpunkt der MRT-Untersuchung 4 Wochen nach dem MI zurückzuführen, welcher bewusst gewählt wurde, um die mittelfristige Regulation nach Herzinfarkt zu beurteilen.

Die vorliegende Arbeit führte zu einer Reihe neuer Erkenntnisse mit Fokus auf die Rolle der Telomerase und zellulärer Seneszenzmarker bei Ischämie-induziertem Myokardremodeling in Mäusen. Die Ergebnisse könnten eine Grundlage für die zukünftige Entwicklung neuer therapeutischer Strategien darstellen. Über eine Beeinflussung der Zellalterung wäre es vielleicht möglich, die Entwicklung einer ischämischen Kardiomyopathie als gefürchtete Folgeerscheinung nach MI, die unter anderem durch maladaptives Remodeling verursacht wird, günstig zu beeinflussen.

## 1.2. Abstract

### **Role of telomerase and cellular senescence in myocardial remodeling after experimental myocardial ischemia in mice**

Cell aging may play an important role in myocardial remodeling, which is a process of adaptation of the cardiac muscle following cardiac damage. The complex regulation of mechanisms such as cell survival / apoptosis, cell proliferation, fibrosis and senescence involve not only the cardiac cells affected by the cardiac damage primarily, but also the immigration and survival of extracardiac cells with the aim of healing, scarring and regeneration. Telomeres and telomere-regulating proteins such as telomerase and telomeric repeat-binding factor 2 are not only important for the regulation and control of cell aging, but are also known for interacting with all of the above-mentioned mechanisms. Using the model of experimental myocardial ischemia by ligating the proximal left anterior descending artery in mice makes it possible to better understand these mechanisms of cell aging following a heart infarction, which have been poorly understood so far. This was the main goal of the present doctoral thesis, which investigated, apart from the study of the cardiac regulation of telomeric parameters in genetically unmodified mice, the causal role of telomerase for both the myocardial remodeling and the regulation in extracardiac organs in knockout mice.

First, we pursued the question whether there was a temporal (day 3, 7 and 28) and regional (infarct and remote zone) different regulation of telomere length, telomerase and telomere-associated proteins after induction of MI by ligation of the proximal LAD. In male 10- to 14-week-old C57Bl/6N wild-type mice, we were able to demonstrate, using the Telomere Repeat Amplification Protocol assay, that initially there was a significant increase in telomerase activity only in the IZ and not in the RZ. On day 7 after surgery there was a further increase, whereby this effect was even more pronounced on day 28 only in the IZ. The telomere length was determined after 4 weeks and was more extended in the RZ than in the IZ. In parallel to the telomerase activity, we simultaneously observed an activation of anti-senescent / anti-apoptotic (TRF2, pAKT) and pro-senescent / pro-apoptotic (p53, cell-cycle checkpoint kinase 2, Bax, p16) signaling pathways. This seemed to be temporary with a maximum on day 7 after MI, and after 4 weeks a counterregulation was found below baseline (TRF2,

p53, Chk2, pAkt) or return to baseline (Bax), respectively. Sirtuin-1 and p16, however, were both significantly upregulated at day 28 after MI.

In addition, three extracardiac organ systems were investigated: 1.) the ascending aorta, since cardiac dysfunction after MI with altered shear forces in central vessels could result in a cellular regulation. The assays did not give a valid result. 2.) The liver, because this organ is sensitive to congestion on the one hand, and is one of the hematopoietic organs of the mouse on the other hand, and thus the source of inflammatory and stem cells that are attracted to the heart by chemokines after ischemia. The most important findings were a reduced telomerase activity and a simultaneously increased expression of Bax and SIRT1 in the animals with MI. 3.) The mononuclear cells in the spleen, as it is also a hematopoietic organ in the mouse, participating in infarct healing via the circulating cells. The results in the heterogeneous population of MNC scattered strongly, similar to those in the aorta. However, there was consistently an increased telomere length after 4 weeks, indicating a recruitment of stem cells with long telomeres from the hematopoietic system.

Furthermore, female 11- to 34-week-old second generation mice (i.e. with not yet shortened telomeres) with global genetic deficiency of telomerase reverse transcriptase, the catalytic subunit of telomerase, were analyzed on day 28 after sham surgery and MI, respectively. In comparison to the C57Bl/6N and the TERT<sup>+/+</sup> animals, mice with MI without telomerase activity showed partially marked differences in the regulation. For example, the telomere length and TRF2 expression were not altered in TERT<sup>-/-</sup> mice with MI, but in the TERT<sup>-/-</sup> in comparison to the TERT<sup>+/+</sup>- sham group the pro-apoptotic proteins p53 and Bax were decreased and the senescence marker p16 was increased, which was not further influenced by the infarction. In histologic examinations, there was also a crucial difference in TERT-deficient animals with MI versus TERT-positive controls: a significant increase of myocardial fibrosis with the Sirius Red staining. This important finding could be substantiated molecular biologically by demonstrating an increased gene expression of Collagen-1 $\alpha$  and Connective Tissue Growth Factor. The above-mentioned alterations of protein expression may be an explanation for the possible influence of TERT deficiency on collagen accumulation. Examinations in extracardiac tissues, similar to the C57Bl/6N animals, resulted in heterogeneous results in the myocardium, but overall indicated an impairment of extracardiac regulation of cardiac remodeling, e.g. lack of MNC with longer telomeres in TERT<sup>-/-</sup> animals with MI, while other regulations were comparable.

---

Another scientific question of this work concerned with the functional consequences of TERT deficiency in the context of MI. The measurement of the indices of heart weight / tibial length and / body weight, lung wet weight / body weight and liver wet weight / body weight indicated that 4 weeks after LAD ligation neither myocardial hypertrophy nor heart failure was present. Cardiac magnetic resonance imaging and Millar catheter verified cardiac dysfunction with reduced pumping performance and pressure load, respectively, due to surgically induced MI, but there were no clear genotypic differences. This is due to the short time of MRI examination 4 weeks after MI, which was deliberately chosen to assess the mid-term regulation after heart infarction.

The present work provided a bunch of new findings focusing on the role of telomerase and cellular senescence markers in ischemia-induced myocardial remodeling in mice. The results could provide a basis for the future development of new therapeutic strategies. By influencing cell aging, it might be possible to favorably influence the development of ischemic cardiomyopathy as a dreaded sequelae of MI caused by maladaptive remodeling, among other things.

## 2. Einleitung

### 2.1. Bedeutung des Alterns für kardiovaskuläre Erkrankungen

Die durchschnittliche menschliche Lebenserwartung hat sich in den Industrienationen seit vielen Jahrzehnten kontinuierlich verlängert. Medizinischer Fortschritt, der Rückgang der Säuglingssterblichkeit sowie verbesserte hygienische und nutritive Lebensbedingungen sind im Wesentlichen für diesen Trend verantwortlich. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind etwa 15% der europäischen Bevölkerung 65 Jahre und älter, was einem fast dreifachen Zuwachs seit dem Jahr 1980 entspricht [1]. Dieser Anteil soll sich bis zum Jahr 2060 auf 30% verdoppeln [1], sodass sie die am schnellsten wachsende Altersgruppe repräsentieren. Diese Altersentwicklung verursacht schon jetzt einen Wandel im Verbreitungsmuster von Krankheiten in der Bevölkerung, da altersassoziierte Erkrankung wie Demenz, Neoplasien und Diabetes mellitus Typ II rapide zunehmen. In gleicher Weise steigen sowohl Prävalenz als auch Inzidenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen [2].

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind nach wie vor die weltweit häufigste Todesursache [1]. Bis zum Jahr 2030 wird ein weiterer globaler Anstieg der kardiovaskulären Sterbefälle erwartet [3], wenngleich die Mortalität der koronaren Herzkrankheit (KHK) in den meisten Ländern der Europäischen Union aufgrund verbesserter medizinischer Versorgungsqualität in den letzten Jahrzehnten bereits drastisch zurückgegangen ist [4]. In Deutschland stellen Krankheiten des Kreislaufsystems mit derzeit 40,2% den maßgebenden Anteil an der Gesamtmortalität in der Bevölkerung dar, wobei KHK, akuter MI und Herzinsuffizienz führend sind [5]. Dabei fallen insgesamt mehr als 90% der kardiovaskulären Sterbefälle auf Patienten mit einem Alter von 65 Jahren und mehr [5]. Darüber hinaus verursachen Herz-Kreislauf-Leiden mit geschätzten 46,4 Milliarden Euro im Jahr 2015 den höchsten ökonomischen Aufwand für das deutsche Gesundheitssystem [6]. Für die kardiovaskuläre Krankheitsprävention gilt im Allgemeinen, dass den meisten Herz-Kreislauf-Erkrankungen durch Vermeidung verhaltensbezogener und somit beeinflussbarer Risikofaktoren, so zum Beispiel

Rauchen, ungesunde Ernährung, Übergewicht und sportliche Inaktivität, vorgebeugt werden kann [1].

Das Alter ist jedoch der entscheidende kardiovaskuläre Risikofaktor [7]. Klinische Studien weisen darauf hin, dass der Faktor „Alter“ bei Patienten mit kardialer Ischämie mit geringerer Überlebenswahrscheinlichkeit und mit höherer Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz korreliert [8]. So wundert es kaum, dass die chronische Herzmuskelschwäche inzwischen der häufigste Grund für stationäre Krankenhausaufenthalte im höheren Alter geworden ist [9]. Der demografische Wandel der Altersstruktur und der damit einhergehend prognostizierte Anstieg der kardiovaskulären Fallzahlen [10] sind somit bezeichnend für die Wichtigkeit der Erforschung zellulärer und molekularer Pathomechanismen des Herz- und Gefäßalters bei kardialer Ischämie im Hinblick auf neue Präventions- und Therapiemöglichkeiten. In diesem Kontext spielt die Erforschung der Regulation der Telomere und der Telomerase bei den Prozessen des biologischen Alterns sowie deren Krankheitsfolgen eine zunehmende Rolle.

## 2.2. Telomerbiologie und Zellseneszenz

Bereits um das Jahr 1940 entdeckten die beiden amerikanischen Genetiker und Nobelpreisträger Hermann J. Muller und Barbara McClintock, dass die Enden von Chromosomen für die Genomstabilität verantwortlich sind, wodurch man ihnen eine maßgebende Rolle für das Zellüberleben zuschrieb [11, 12]. Fortan wurden diese Strukturen als Telomere, etymologisch abgeleitet von den griechischen Wörtern *télos* (Ende) und *méros* (Teil), bezeichnet. Erst Anfang der 1990er Jahre wurde den Telomeren eine kausale Rolle in den biologischen Alterungsprozessen zugewiesen, als man erstmals demonstrieren konnte, dass sich die Länge der Telomere im Laufe des Alterns *in vitro* und *in vivo* verkürzt [13-15]. Wenige Jahre zuvor entdeckten Elizabeth H. Blackburn und ihre Doktorandin Carol W. Greider ein Enzym, die sogenannte Telomerase, welches der Telomerverkürzung im Rahmen der Zellteilung entgegenwirkt [16]. Für ihre herausragenden Pionierarbeiten in der Telomerforschung wurden die beiden, gemeinsam mit Jack W. Szostak, im Jahr 2009 mit dem Nobelpreis für Physiologie / Medizin ausgezeichnet.

### 2.2.1. Telomerkomplex

Telomere liegen wie Schutzkappen an den distalen Chromosomenenden eukaryoter Zellen und bewahren die kodierenden Abschnitte der Desoxyribonukleinsäure (DNA) so vor enzymatischer Degradation, Rekombination und weiteren strukturellen Aberrationen [17, 18]. Sie bestehen aus nichtkodierender, vorwiegend doppelsträngiger DNA, welche sich bei Vertebraten aus vielen hunderten bis tausenden Wiederholungen der evolutionär hoch konservierten Basenabfolge 5'-(TTAGGG)<sub>n</sub>-3' zusammensetzt [19]. Die Häufigkeit dieser repetitiven DNA-Sequenzen ist sowohl spezies-, als auch zell- und altersabhängig, wobei die Telomerlänge zwischen 2 und 15 Kilobasenpaare bei Menschen [20] und zwischen 40 und 80 Kilobasenpaare bei Labormäusen variiert [21]. Am 3'-Ende des telomerischen Leit- und Folgestranges befindet sich ein etwa 125 bis 275 Basenpaare langer, einzelsträngiger DNA-Überhang [22, 23], welcher unter Formation einer *T*-(telomeric)- und einer D-(displacement)-Schleife in die doppelsträngige Telomer-DNA integriert wird [24, 25] und für den Prozess der Telomerverlängerung von essentieller Bedeutung ist. Aufgrund des dort überproportionalen Vorkommens an Guanin bilden sich intramolekulare G-Quadruplexe aus, welche gemeinsam mit den Schleifen eine räumlich stabilere Sekundärstruktur darstellen [26, 27]. Unter der Kontrolle telomerstabilisierender Proteine werden diese Strukturen zusammengehalten, wobei *telomere repeat-binding factor* (TRF) 1 und TRF2 als Homodimere über integrierte Myb-DNA-Domänen [28] direkt an die doppelsträngige Telomerschleife binden. Beide dienen als eine Art Plattform für die Anheftung und Interaktion mit einer Reihe weiterer Proteine, welche man in ihrer Gesamtheit als *Shelterin*-Komplex bezeichnet [29] (*Abbildung 1*).

Für die Schutzfunktion dieser Einheit spielt TRF2 aufgrund seiner Bedeutung bei der strukturellen Aufrechterhaltung der T-Schleife die wahrscheinlich maßgeblichste Rolle [30]. Im Rahmen dessen wird das zelleigene DNA-Reparatursystem unterdrückt, da der einzelsträngige 3'-Überhang von pathologischen Strangbrüchen unterschieden [31] und strukturelle Anomalien wie End-zu-End-Fusionen vermieden werden können [32]. Griffith *et al.* wiesen zudem darauf hin, dass TRF1 an der Ausbildung der T-Schleifen mitverantwortlich ist [33], funktionell jedoch möglicherweise die Verlängerung der Telomere eher negativ reguliert. Ursächlich dafür werden die



Begünstigung der geschlossenen telomerischen Form durch T-Schleifen bei ausreichender Telomerlänge und andere Faktoren vermutet [34], [35]. Kritisch kurze Telomere liegen hingegen mit erhöhter Wahrscheinlichkeit in geöffneter Form vor, so dass die Präsenz von TRF1 oder TRF2 die enzymatische Elongation nicht inhibiert, die Zelle bei jedoch unzureichender Telomerasekonzentration bzw. -aktivität in den Zellzyklusarrest übergehen kann [36].

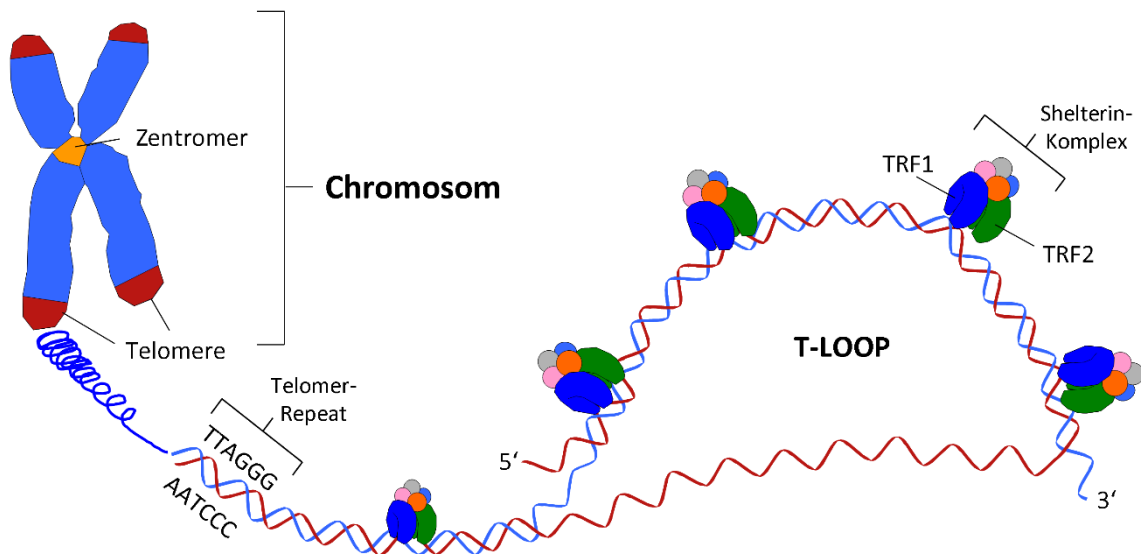


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Telomerkomplexes, in Anlehnung an Calado et al. [47].

### 2.2.2. Endreplikationsproblem und Telomerase

Ähnlich einer tickenden molekularen Uhr des Erbgutes nimmt nach jeder Mitose die Telomerlänge der Tochterzellen kontinuierlich ab. Diesem Mechanismus liegt das bereits seit Anfang der 1970er Jahre postulierte Endreplikationsproblem ursächlich zugrunde [37, 38]. Voraussetzung für die Zellkernteilung ist die vorherige Duplikation der chromosomalen DNA in der Interphase des Zellzyklus. Die hierfür zuständige DNA-Polymerase I benötigt für die Synthese der Tochterstränge kurze Ribonukleinsäure (RNA)-Primer, welche sie ausschließlich vom 5'- zum 3'-Ende verlängern kann. Aus diesem Grund ist lediglich die Replikation des Leitstranges kontinuierlich und vollständig; am 5'-Ende des Folgestranges kann der äußerste RNA-Primer nach enzymatischer Entfernung hingegen nicht mit komplementärer DNA (cDNA) ersetzt werden [13], so dass pro Zellteilung an beiden Chromosomenenden der Tochterstränge etwa 50 bis 200 Basenpaare verloren gehen [39]. Dies schränkt

die Anzahl an Zellteilungen, bezeichnet als *Hayflick Limit*, bei somatischen Zellen *in vitro* auf etwa 50 ein [40]. Gewebe mit hoher Rate an Mitosen können dem replikationsabhängigen Verlust der Telomerlänge jedoch enzymatisch entgegenwirken um länger teilungsfähig oder sogar unsterblich zu bleiben.

Diese Rolle übernimmt die Telomerase, ein spezialisierter Ribonukleoproteinkomplex, welcher seine höchste enzymatische Aktivität in Tumor- [41], Keimbahn- und embryonalen Stammzellen [42] erlangt. Dazu erfolgt zunächst die Hybridisierung zwischen der in ihr integrierten RNA-Matrize *telomerase RNA content* (TERC) und dem 3'-G-Überhang [43]. Mittels der katalytischen Untereinheit TERT [44] führt sie anschließend die Elongation des 3'-Endes des telomerischen Leit- und Folgestranges durch. Neben der Telomereelongation hat die Telomerase, synergetisch mit dem *Shelterin*-Komplex, eine protektive Wirkung auf die distalen Chromosomenenden [45]. Ihre medizinische Relevanz zeigt sich unter anderem durch verkürzte Lebensdauer, Infertilität, Immunoseneszenz sowie organische Dysfunktionen der Versuchstiere in Knockout-Experimenten [46]. Die beschleunigte Erosion der Telomere bei Menschen mit Dyskeratosis congenita, aplastischer Anämie und myelodysplastischem Syndrom konnte auf den Nachweis von Mutationen innerhalb der Komponenten der Telomerase zurückgeführt werden [47].

Nach aktuellem Forschungsstand scheint die Integrität der Telomere jedoch nicht nur durch die Telomerase und den *Shelterin*-Komplex, sondern auch durch epigenetische Mechanismen [48] bzw. in Tumorzellen durch alternative Telomerverlängerung (*alternative lengthening of telomeres, ALT*) [49] reguliert zu werden. Über die Homöostase der Telomerlänge hinaus sind Telomerkomplex und Telomerase in der Regulation der DNA-Schadensreparatur, des Zellzyklus und des programmierten Zelltodes involviert [50]. Zudem kann die Telomerase bei Akkumulation von oxidativem Stress aus dem Zellkern in die Mitochondrien transportiert werden und dort die schädliche Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies vermindern [51].

### 2.2.3. Seneszenz

Der Begriff der Seneszenz, etymologisch abgeleitet vom lateinischen Wort *senescere* (alt werden), umfasst die im Allgemeinen irreversiblen Vorgänge des biologischen Alterns sowie deren Folgen, vom Organismus bis zur einzelnen Zelle. Diese Prozesse sind auf zellulärer Ebene durch Verlust der proliferativen Kapazität, irreversiblen Wachstumsarrest, programmierten Zelltod oder eine Kombination dieser Phänomene gekennzeichnet. Zudem sind Veränderungen der Zellmorphologie sowie funktionelle Modifikationen hinsichtlich des Zellstoffwechsels und der Genregulation beschrieben [52]. Die sogenannte replikative Seneszenz ist dabei Teil eines natürlichen altersabhängigen Geschehens und charakterisiert das Erreichen der kritischen Mindestlänge der Telomere, wodurch Zellen ohne aktive Telomerase in unterschiedlichen Lückenphasen (*gap*-Phasen) des Zellzyklus in postmitotischen Ruhezustand verbleiben [53]. Diese Kontrollpunkte im Zellzyklus gewährleisten den Schutz des Organismus vor ungebremster Zellproliferation im Sinne maligner Entartung [54]. Davon abzugrenzen sind pathologisch verfrühte Zellalterungserscheinungen, die sogenannte „Stress-induzierte“ prämaturne Seneszenz (SIPS). Die molekularen Mechanismen, welche dieser Form der Alterung zugrunde liegen, werden mutmaßlich durch komplexe Signalwege beschrieben und durch das Vorkommen freier Radikale in Gang gesetzt [55].

#### 2.2.3.1. Signalwege

Am Anfang der Seneszenzmaschinerie steht der oxidative DNA-Schaden bzw. die fortgeschrittene Telomerosion, was zur Aktivierung des Tumorsuppressors *Cell Cycle Checkpoint-Kinase 2* (Chk2) führt. Chk2 triggert die replikative Seneszenz [56], indem sie in geschädigten Zellen p53 *in vivo* stabilisiert, was zum Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>-Phase führt [57]. Die Einleitung des Zellzyklusarrests kann hingegen durch direkte Hemmung von Chk2 durch TRF2 verhindert werden [58].

P53, der sogenannte „Wächter des Genoms“, ist der wichtigste Tumorsuppressor und hat in seiner aktivierten, phosphorylierten Form vielfältige Funktionen inne: er reguliert das Überführen DNA-geschädigter Zellen in Apoptose und in permanenten

Wachstumsarrest, leitet aber auch DNA-Reparaturmechanismen ein [59]. Liegt eine Überaktivierung von p53 beispielsweise bei oxidativem Stress vor, führt dies zu einer Beschleunigung der Zellalterung [60]. Nach Inaktivierung des p53-Gens kann die proliferative Kapazität seneszenten Zellen *in vitro* wieder eingeleitet und so der Arrest in der G<sub>1</sub>-Phase aufgehoben werden. Der Verlust seiner Funktion spielt somit auch eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Krebs [61, 62].

Im Gegenzug dazu ist SIRT1, eine Histondeacetylase [63], ein positiver Regulator der Telomerlänge [64]. Generell unterstützt es die Genomstabilität und inhibiert Zellwachstum [65]. Dabei deacetyliert es, neben einer Reihe anderer Proteine, das Protein p53, wodurch dieses in seiner Aktivität gebremst wird [66]. Eine Herunterregulation von SIRT1 hingegen führt zu einer Aktivierung von p53 und somit zur Einleitung der prämaternen Seneszenz [67]. SIRT1 wird als wesentlicher Mediator einer Verlängerung der Lebensspanne durch Kalorienrestriktion oder Einnahme von Quercetinen und Resveratrol angesehen.

Apoptotische Prozesse, wie sie im Rahmen prämaturner Seneszenzen zum Schutz des Organismus ablaufen können, werden unter anderem durch die Proteinkinase B, im Weiteren auch als AKT bezeichnet, beeinflusst. In phosphorylierter Form pAKT ist es in die Regulation zahlreicher zellulärer Mechanismen involviert [68]. Von herausragender Bedeutung ist dabei die Rolle auf die direkte Hemmung des programmierten Zelltodes, indem es pro-apoptotische Proteine aus der Bcl2-Familie, allen voran Bax, inhibiert und so die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien verhindert [69]. Im Gegensatz dazu wird Bax durch p53 induziert [70].

Als typischer Marker für molekulares Altern ist p16, auch bekannt als *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, in seneszenten Zellen überexprimiert [71-73]. Dieses ebenfalls als Tumorsuppressor bekanntes Protein hemmt Zyklin-abhängige Kinasen und reguliert somit negativ den Zellzyklus am G<sub>1</sub>/S-Kontrollpunkt [74]. Die Regulation über die vermehrte Expression von p16 scheint dabei auch unabhängig von der Telomerlänge und von der Signalkaskade über Chk2 und p53 abzulaufen [75]. Neben p16 ist die seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Galaktosidase (Produkt des GLB1-Gens) ein etablierter Biomarker für zelluläre Seneszenz [76, 77], basierend auf der Akkumulation von lysosomalem Inhalt in seneszenten Zellen [78].

## 2.3. Myokardiales Remodeling bei Ischämie

Zahlreiche kardiovaskuläre Erkrankungen induzieren reaktiv morphologische, elektromechanische und biochemische Veränderungen des Myokards. Bei diesen komplexen heterogenen Umbauvorgängen, bezeichnet als kardiales Remodeling, werden Größe, Form und Funktion des Herzens durch mechanische, neuroendokrine und genetische Faktoren zunächst kompensatorisch reguliert [79, 80]. Ein über die Zeit progredient maladaptives Remodeling führt jedoch konsekutiv zum klinischen Syndrom der Linksherzinsuffizienz [81]. Die Framingham-Herz-Studie demonstrierte, dass ätiologisch mehr als die Hälfte dieser Fälle auf Durchblutungsstörungen des Herzmuskels zurück zu führen sind [82]. Die Prognose ist trotz stetig verbesserter medikamentöser und apparativer Therapiemaßnahmen weiterhin unbefriedigend: die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt selbst in Industrieländern lediglich um die 50% [83].

Einem Herzinfarkt gehen in der Regel atherosklerotische Plaques in der Gefäßwand der Koronararterien voraus. Infolge der progressiven Stenosierung des vaskulären Lumens entsteht so ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf in den nachfolgenden Myokardarealen, dem klinischen Bild einer KHK entsprechend. Bei einer Ruptur instabiler Plaques werden prokoagulatorische Stoffe wie *Tissue Factor* freigesetzt, welche zur Aggregation von Thrombozyten und folglich zur Bildung eines Thrombus führen. Aufgrund der akuten koronaren Okklusion entsteht so bei nicht ausreichender Reperfusion eine regionale Nekrose des Myokards.

### 2.3.1. Zeit- und gebietsabhängige Dynamik der pathophysiologischen Vorgänge

Die Heilungsphase des Herzmuskels impliziert die sich zeitlich überlappenden Vorgänge der Inflammation, der Bildung von Granulationsgewebe, der Narbenbildung und dem ventrikulärem Remodeling als Reaktion auf die akute kardiale Ischämie. Bei Mäusen kann man die einzelnen Zeitabschnitte in die frühe Wundheilungsphase an Tag 0-7, Granulationsphase und frühes Remodeling an Tag 7-21 und spätes Remodeling ab Tag 21 grob unterteilen [84].

Nach kardialem Zellsterben findet initial, unter der Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies, eine ausgeprägte humorale Entzündungsreaktion im infarzierten Gebiet statt. Infolge der Degradation extrazellulärer Matrix durch aktivierte Matrixmetalloproteinasen [84] infiltrieren inflammatorische Zellen, insbesondere neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen, das betroffene Gewebe und sezernieren unter anderem proteolytische Enzyme, Zytokine und Wachstumsfaktoren [85]. Diese Vorgänge ziehen eine Ausbreitung des Infarktgebietes nach sich [86]. Die IZ ist hauptsächlich durch Nekrose [87], die RZ des infarzierten Gebietes hingegen durch Apoptose der Kardiomyozyten gekennzeichnet [88].

In der frühen Remodelingphase phagozytieren Makrophagen zunächst das nekrotische Zellmaterial unter der provisorischen Ausbildung von Granulationsgewebe. Die Mastzelldegranulation führt zur Proliferation der einwandernden Fibroblasten mit konsekutiver Synthese und Einlagerung von desorganisiertem Bindegewebe [85]. Diese reparative Fibrose ist für die Ausbildung der Infarkt Narbe verantwortlich [89]. Die voranschreitende Expansion der IZ führt weiterhin zur Ausdünnung der Herzwand mit ventrikulärer Dilatation. Durch die Veränderung der kardialen Architektur steigt daher sowohl die systolische als auch diastolische Wandspannung an. Unter dem Einfluss neurohumoraler Mechanismen, initiiert durch den erhöhten hämodynamischen Stress, schreitet indes eine Hypertrophie der Kardiomyozyten im nicht-infarzierten Areal progressiv voran [90]; diese zielt darauf ab, die Pumpfunktion des Herzens aufgrund des Gewebeverlustes kompensatorisch zu steigern [91]. Beltrami *et al.* zeigten, dass einige Kardiomyozyten im Infarkttrandgebiet entgegen ursprünglichen Meinungen proliferieren und sich regenerieren können [92]. Die Angio- und Arteriogenese durch Endothelzellen aus der Grenzzone des Infarkts spielen für das frühe Remodeling ebenfalls eine bedeutsame Rolle [93]. Im Zuge der Stammzellforschung wurde die Hypothese aufgestellt, dass nach induzierter Gewebeischämie mobilisierte endotheliale Progenitorzellen aus dem Knochenmark zur Neovaskularisation, vermutlich gemeinsam mit residenten kardialen Stammzellen [94], im betroffenen Areal beitragen können [95, 96]. Diese Zellmigration wird als *Homing* bezeichnet [97] und sorgt für die Vaskulogenese, also einem Prozess unabhängig von bereits vorbestehenden Gefäßen.

Das ventrikuläre Remodeling in der Spätphase nach MI ist ein über Monate und Jahre sich hinziehender Prozess, welcher den gesamten Herzmuskel der linken Herzhälfte involvieren und in chronischer Herzinsuffizienz münden kann. Die Kombination aus

Volumen- und Druckbelastung führt linksventrikulär (LV) zu einer Dilatation mit Ausdünnung der infarzierten Wandbereiche und Verdickung des nichtinfarzierten Myokards. Die zunehmende Veränderung der kardialen Architektur und die progressive globale Hypokontraktilität werden hauptsächlich der myokardialen Dilatation, pathologischen Hypertrophie, Expansion der IZ und der Fibrose geschuldet. Insbesondere die progressive Dilatation des linken Ventrikels mit nachfolgend systolischer Dysfunktion ist in dieser Phase prognostisch ungünstig [98].

## **2.4. Bedeutung der Telomerbiologie und der Seneszenz für kardiovaskuläre Erkrankungen**

### **2.4.1. Kardiovaskuläres Zellaltern im Allgemeinen**

Obschon das Altern der Gefäße und des Herzens, unabhängig von kardiovaskulären Noxen, im Laufe der Zeit physiologischen Veränderungen unterliegt, bewirkt es im höheren Lebensalter zwangsläufig eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber der Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Dieser unvermeidbare, als primäres Altern bezeichnete Prozess wird durch systemische und lokale zelluläre Stressoren, z.B. in Form von oxidativem Stress, sekundär beschleunigt [99]. Insbesondere auch kardiovaskuläre Risikofaktoren und Ereignisse, wie beispielsweise ein akuter MI, führen zu einer Akzeleration der sogenannten prämaturnen Seneszenz [100]. Vor allem die Beschleunigung zellulärer Alterungsprozesse durch Ischämie und Inflammation spielen scheinbar eine bedeutsame Rolle bei der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Ob nun allerdings das beschleunigte Zellaltern die Folge des Krankheitsprozesses ist oder umgekehrt, bleibt bislang nicht sicher geklärt.

Generell sind Kardiomyozyten sehr langlebige Zellen mit geringer Apoptoserate [101]. Im Laufe der Zeit verliert das alternde Herz jedoch, selbst ohne kardiale Grunderkrankung, durchschnittlich 30% dieser Zellart [102]. Ursächlich liegt diesem kumulativen Zellverlust die altersbedingte Zunahme der Apoptoserate [103], insbesondere aufgrund des vermehrten oxidativen Stresses mit bioenergetischer Dysfunktion und struktureller Desorganisation der Mitochondrien, zu Grunde [104].

Kompensatorische Mechanismen reagieren daher zunächst mit vermehrter Bildung extrazellulärer Matrix [105] und gesteigerter myozytärer Hypertrophie [102]. Durch das stetig wachsende Unvermögen den Verlust der kardialen Masse auszugleichen, hat das Herz im höheren Alter jedoch reduzierte kompensatorische Kapazitäten [102]. Folgt obendrein eine kardiale Schädigung wie durch einen Herzinfarkt, eine Hypoxie-induzierte Ischämie oder vermehrte kardiale Druckbelastung, nehmen myokardiale Apptoserate, Hypertrophie und Fibrose überproportional stark zu [106, 107]. Zudem kann im höheren Alter der steigende Bedarf an autophagischen Prozessen nicht gedeckt werden, da gleichzeitig die Fusion zwischen Lysosomen und Autophagosomen ineffektiver wird. Durch die gestörte intrazelluläre Homöostase steigt daher die Konzentration an freien Radikalen, geschädigten Proteinen und Organellen sowie dem Alterspigment Lipofuszin zunehmend an [108]. Zudem führt die verminderte kardiomyozytäre Fähigkeit zur Regeneration im höheren Alter, ursächlich bedingt durch die Abnahme von Mitosen und Stammzellfunktionen, zu einer schwerwiegenderen linksventrikulärer Dysfunktion [88].

#### **2.4.2. Kardiovaskuläres Zellularaltern im Speziellen**

Bereits Anfang der 1970er Jahre wurde zelluläre Seneszenz mit Atherogenese kausal in Zusammenhang gebracht [100] – seither gilt die Atherosklerose als Prototyp altersassoziiertes Erkrankungen. Mittlerweile hat das bessere Verständnis der Telomerbiologie zur Hypothese geführt, dass die Regulation der Telomere beim Pathomechanismus kardiovaskulärer Erkrankungen eine Rolle spielen. Matthews *et al.* demonstrierten in *in vitro*-Analysen, dass Atherosklerose durch seneszente Gefäßmuskelzellen mit beschleunigter Telomerverkürzung und verminderter Telomeraseaktivität charakterisiert ist; der Schweregrad der Plaquebildung korrelierte dabei eng mit der Telomerverkürzung [109]. In Analogie dazu zeigen Erkrankungen, welche zum Formenkreis der Progerie gehören, dass schon bei kindlichen Patienten die prämatüre vaskuläre Seneszenz frühzeitig zu Atherosklerose mit erhöhter kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität führt. Dies geschieht selbst in Abwesenheit der üblichen Einflussfaktoren der Erwachsenenpopulation wie Rauchen und Übergewicht [143]. Dysfunktionale Telomere scheinen daher auch bei diesem Krankheitsbild für die Pathogenese eine tragende Rolle zu spielen [144]. Der



progressive Alterungsprozess in den Gefäßen bei auch ansonsten scheinbar gesunden Individuen scheint als bedeutsamer Faktor für kardiovaskuläre Ereignisse verantwortlich zu sein [110, 111].

In einer Pilotstudie aus dem Jahr 2001 wurden erstmals bei Patienten mit KHK verkürzte Telomere in leukozytärer DNA nachgewiesen [112]. Ähnliche Ergebnisse konnten bei Patienten mit Herzinfarkt, Bluthochdruck und Diabetes mellitus erzielt werden [113-115]. In einer klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass die Telomeraseaktivität in Leukozyten bei steigendem Level an oxidiertem *Low Density Lipoprotein* (LDL)-Cholesterin im Patientenserum vermindert ist. Dies führte zur Hypothese, dass prämaturne Seneszenz in engem Zusammenhang mit der Entstehung von Atherosklerose durch oxidiertes LDL-Cholesterin induziert wird [116]. Kontroverse Studien, wie beispielsweise eine groß angelegte norwegische Kohortenstudie, stellten jedoch fest, dass bei gesunden Studienteilnehmern über 65 Jahre längere Telomere in Leukozyten mit einem höheren Risiko für einen MI assoziiert sind [117]. Haver *et al.* postulierten, dass nach stattgehabtem Transmuralinfarkt die leukozytäre Telomerlänge keinen Effekt auf das kardiale Remodeling und die Funktion habe [118]. Inwiefern daher eine Blutanalyse mit Messung der leukozytären Telomerlänge als Surrogatparameter vor oder nach MI eine Rolle spielen könnte, bleibt daher zu klären. Eine Reihe anderer Studien zeigte wiederum, dass die Regulation der Telomerbiologie nicht nur einen Biomarker für die Akkumulation oxidativer Schäden darstellen, sondern Teil eines bisher nicht vollständig entschlüsselten aktiven Regulationsprozesses sein könnten. Unterstützt wird diese Hypothese durch die kürzlich publizierte Studie von Richardson *et al.*, dass eine Kryoverletzung des Herzens zu einer Heraufregulation der kardialen Telomeraseaktivität führt [119]. Leider reichen die bisherigen Erkenntnisse nicht aus, um eine Aussage darüber zu treffen, ob bei kardialer Schädigung ein organ- bzw. zelltypspezifischer systemischer Effekt auf die Telomerbiologie vorliegt. Einen Erklärungsansatz lieferten Kissel *et al.* [120]. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass Patienten nach erlittenem MI vor allem in Lymphozyten und deren Vorläuferzellen auf Knochenmarkebene erodierte Telomere aufweisen, welches mit erhöhtem Zellumsatz durch oxidativen Stress erklärt wurde. Rezenterer Studiendaten weisen darauf hin, dass auf molekularer Ebene einige nicht-kodierende kurze RNAs, sogenannte microRNAs, als bedeutsame Regulatoren bei der kardiovaskulären Zellalterung fungieren [121, 122]. Dabei scheint die microRNA-34a einen zentralen Stellenwert einzunehmen [123].

Die logische Konsequenz nach diesen Studien war die Untersuchung präventiver bzw. therapeutischer Maßnahmen auf eine positive Beeinflussung der Telomerbiologie. Dabei konnte man nachweisen, dass die Geschwindigkeit der leukozytären Telomererosion durch Lebensstiländerung und Statineinnahme positiv beeinflusst wird [124, 125]. Kürzlich konnte dieser Effekt in einer prospektiven randomisierten Studie mit Atorvastatin untermauert werden [126]. Insbesondere Ausdauersport scheint auch ein bedeutender Faktor für die negative Regulation der zellulären Seneszenz in der Aortenwand und in Leukozyten zu sein [127]. Inwiefern diese Konzepte dem Zellaltern direkt im Herzmuskel entgegenwirken bleibt zu klären. Mittlerweile wird die Telomerlänge der Leukozyten als Surrogatparameter für die Gefäßalterung angesehen, weil z.B. in einer Autopsiestudie gezeigt werden konnte, dass sie direkt mit der Telomerlänge aortaler Zellen korreliert [128]. Dementsprechend ist die Erforschung der Rolle des Telomerkomplexes, der Telomerase und der Seneszenzvorgänge bei kardiovaskulären Erkrankungen, über die Leukozytentelomerlänge hinaus, dringend notwendig.

## 2.5. Zielsetzung und wissenschaftliche Fragestellungen

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Telomerbiologie und der zellulären Seneszenz bei Ischämie-induziertem Myokardremodeling in WT- und TERT<sup>-/-</sup>-Mäusen. Der aktuelle Kenntnisstand ist, dass nach MI seneszente Zellen, mutmaßlich hauptsächlich Myofibroblasten, im Herzmuskel akkumulieren [129]. Die Regulation der Telomerase und telomer-stabilisierender Proteine im dynamischen Prozess des Myokardremodelings nach akuter Ischämie ist jedoch noch weitgehend unerforscht. Folgende Fragestellungen sollten daher überprüft werden:

- Liegen zeitlich dynamische oder örtliche Differenzen hinsichtlich der Regulation der Telomerbiologie und der zellulären Seneszenz im ischämisch geschädigten Myokard vor?
- Zeigen sich systemische Effekte auf diese Signalwege?
- Welcher Einfluss hat eine genetische Defizienz der TERT auf diese Regulationen?
- Korrelieren etwaige molekularbiologische Effekte mit funktionellen und/oder morphologischen Veränderungen?

### 3. Material und Methodik

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Die Chemikalien und Reagenzien, welche für die Durchführung der Arbeit wesentlich waren, sind in *Tabelle 1* aufgelistet oder im Zusammenhang mit der jeweiligen Methode erwähnt. Allgemeine Verbrauchsmaterialien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von den Firmen Merck, Sigma-Aldrich oder VWR bezogen.

Produkt	Hersteller
<b>0,9% NaCl-Lösung</b>	B.Braun (Melsungen, DE)
<b>1 Kb Plus DNA Ladder™</b>	Invitrogen (Karlsruhe, DE)
<b>10x Reaction buffer</b>	Peqlab (Erlangen, DE)
<b>Acrylamide/Bis Solution 30%, 29:1 (3,3% C)</b>	Bio-Rad (München, DE)
<b>Agarose</b>	Lonza (Rockland, USA)
<b>Algezid II</b>	AgfaPhoto (Leverkusen, DE)
<b>APS (Ammoniumpersulfat)</b>	Serva (Heidelberg, DE)
<b>Ampuwa (Aqua dest.)</b>	B.Braun (Melsungen, DE)
<b>Aprotinin, From Bovine Lung</b>	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, DE)
<b>Aqua ad iniectabilia</b>	Braun (Melsungen, DE)
<b>Biocoll Separating Solution</b>	Biochrom AG (Berlin, DE)
<b>Bovines Serumalbumin</b>	Invitrogen (Karlsruhe, DE)
<b>Bromphenolblau</b>	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, DE)
<b>Citraconsäureanhydrid</b>	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, DE)
<b>Chloroform</b>	Merck (Darmstadt, DE)
<b>DC™ Protein Assay Reagent</b>	Bio-Rad (München, DE)

<b>DEPC (Diethylpyrocarbonat)</b>	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, DE)
<b>Dinatriumhydrogenphosphat</b>	Merck (Darmstadt, DE)
<b>DTT (Dithiothreitol)</b>	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, DE)
<b>ECL™ Western Blotting Detection</b>	GE Healthcare (Freiburg, DE)
<b>EDTA (Ethyldiamintetraacetat)</b>	Merck (Darmstadt, DE)
<b>Entellan®</b>	Merck (Darmstadt, DE)
<b>Entwickler G153</b>	AgfaPhoto (Leverkusen, DE)
<b>Essigsäure (Eisessig) 100%</b>	Merck (Darmstadt, DE)
<b>Ethanol</b>	VWR (Darmstadt, DE)
<b>Ethidiumbromid</b>	VWR (Darmstadt, DE)
<b>Fixateur G354</b>	AgfaPhoto (Leverkusen, DE)
<b>Formaldehyd-Lösung 37%</b>	Roth (Karlsruhe, DE)
<b>FKS (fetales Kälberserum)</b>	Invitrogen (Karlsruhe, DE)
<b>Glycerol</b>	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, DE)
<b>Glycin</b>	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, DE)
<b>Isofluran®</b>	Baxter (Unterschleißheim, DE)
<b>Isopropanol</b>	Merck (Darmstadt, DE)
<b>Kaliumchlorid</b>	Merck (Darmstadt, DE)
<b>Kaliumdihydrogenphosphat</b>	Merck (Darmstadt, DE)
<b>Ketavet 10% (Ketaminhydrochlorid)</b>	Pfizer (Karlsruhe, DE)
<b>Leupeptin</b>	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, DE)
<b>Low Range Marker</b>	Bio-Rad (München, DE)
<b>Methanol</b>	VWR (Darmstadt, DE)
<b>Natriumchlorid</b>	Merck (Darmstadt, DE)
<b>peqGOLD dNTP-Mix</b>	Peqlab (Erlangen, DE)
<b>peqGOLD RNA Pure™</b>	Peqlab (Erlangen, DE)
<b>Pikrinsäure</b>	Merck (Darmstadt, DE)
<b>PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)</b>	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, DE)
<b>Power SYBR® Green</b>	Invitrogen (Karlsruhe, DE)
<b>Rimadyl® 5% (Carprofen)</b>	Pfizer (Karlsruhe, DE)
<b>RNasin® Ribonuclease Inhibitor</b>	Promega (Mannheim, DE)
<b>Rompun® 2% (Xylazinhydrochlorid)</b>	Bayer Healthcare (Berlin, DE)

<b>Sirius Red</b>	Polysciences (Eppelheim, DE)
<b>SDS (Sodiumdodecylsulfat)</b>	Roth (Karlsruhe, DE)
<b>Taq-DNA-Polymerase</b>	Peqlab (Erlangen, DE)
<b>TEMED (Tetramethylethyldiamin)</b>	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, DE)
<b>TRAPeZe® 1x CHAPS Lysis Buffer</b>	Merck (Darmstadt, DE)
<b>tri-Natrium-Citrat-Dihydrat</b>	VWR (Darmstadt, DE)
<b>TRIS (tris-aminomethan) base</b>	VWR (Darmstadt, DE)
<b>TRIS HCl</b>	Merck (Darmstadt, DE)
<b>Trockenmilchpulver aus Magermilch</b>	TSI (Zeven, DE)
<b>Türks-Lösung</b>	Merck (Darmstadt, DE)
<b>Tween®20 (Polysorbat 20)</b>	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, DE)
<b>Xylen Cyanol F</b>	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, DE)

*Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.*

*Produkt, Hersteller.*

### 3.1.2. Antikörper

#### 3.1.2.1. Primärantikörper zur Immundetektion

<b>Protein</b>	<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
<b>Akt (60 kDa)</b>	polyklonales anti-Akt Immunglobulin (Ig) G Kaninchen (Cell Signaling, Frankfurt/Main, DE)	1:500
<b>Bax (21 kDa)</b>	monoklonales anti-Bax IgG <sub>2b</sub> Maus (Epitomics, Burlingame, USA)	1:500
<b>Bcl2 (26 kDa)</b>	polyklonales anti-Bcl2 IgG Kaninchen (Santa Cruz, Heidelberg, DE)	1:250
<b>Chk2 (66 kDa)</b>	monoklonales anti-Chk2 IgG <sub>1</sub> Maus (Santa Cruz, Heidelberg, DE)	1:500
<b>GAPDH (37 kDa)</b>	monoklonales anti-GAPDH IgG <sub>1</sub> Maus (Santa Cruz, Heidelberg, DE)	1:10.000
<b>GLB1 (67 kDa)</b>	monoklonales anti-GLB1 IgG Kaninchen (ProteinTech Group Inc., Illinois, USA)	1:500

<b>p16</b> <b>(16 kDa)</b>	monoklonales anti-p16 IgG <sub>2a</sub> Maus (Santa Cruz, Heidelberg, DE)	1:500
<b>p53</b> <b>(53 kDa)</b>	monoklonales anti-p53 IgG <sub>1</sub> Maus (Santa Cruz, Heidelberg, DE)	1:500
<b>pAkt</b> <b>(60 kDa)</b>	polyklonales anti-pAkt (Ser473) IgG Kaninchen (Cell Signaling, Frankfurt/Main, DE)	1:500
<b>SIRT1</b> <b>(130 kDa)</b>	monoklonales anti-SIRT1 IgG <sub>1</sub> Maus (Santa Cruz, Heidelberg, DE)	1:500
<b>TRF2</b> <b>(70 kDa)</b>	monoklonales anti-TRF2 IgG <sub>1</sub> Maus (Santa Cruz, Heidelberg, DE)	1:500

*Tabelle 2: Primärantikörper zur Immundetektion.*

*Zu detektierende Proteine mit Angabe ihres Molekulargewichts, verwendete Antikörper, Hersteller, Spezies, Verdünnung in 1xPBS-Tween.*

### 3.1.2.2. Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper zur Immundetektion

Spezies	Antikörper	Verdünnung
<b>Kaninchen</b>	Peroxidase-gekoppeltes anti-Kaninchen IgG (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE)	1:5.000
<b>Maus</b>	Peroxidase-gekoppeltes anti-Maus IgG (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE)	1:5.000

*Tabelle 3: Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper zur Immundetektion.*

*Spezies, Antikörper, Hersteller, Verdünnung in 1xPBS-Tween.*

### 3.1.3. Primer

#### 3.1.3.1. Primer für RNA-basierte Real-Time PCR-Analysen

Die synthetischen Oligonukleotide für die RNA-basierten Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Analysen wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, DE) bezogen und sind in *Tabelle 4* aufgeführt.

Primer	Sequenz
<b>18S-fwd</b>	5'-TTGATTAAGTCCCTGCCCTTTGT-3'
<b>18S-rev</b>	5'-CGATCCGAGGGCCTCACTA-3'
<b>Collagen-1<math>\alpha</math>-fwd</b>	5'- GAGCGGAGAGTACTGGATCG -3'
<b>Collagen-1<math>\alpha</math>-rev</b>	5'- GCTTCTTTTCCTTGGGGTTC -3'
<b>CTGF-fwd</b>	5'- AGCAGCTGGGAGAACTGTGT -3'
<b>CTGF-rev</b>	5'- GCTGCTTTGGAAGGACTCAC -3'
<b>GAPDH-fwd</b>	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
<b>GAPDH-rev</b>	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'
<b>GLB1-fwd</b>	5'-TTTAACCTCGGCCGATACTG-3'
<b>GLB1-rev</b>	5'-ACCGATGGTCAAGTCAGGTC-3'
<b>p16-fwd</b>	5'-ACGGTGCAGATTCGAACTGC-3'
<b>p16-rev</b>	5'-TACACAAAGACCACCCAGCG-3'
<b>p53-fwd</b>	5'-GGGACAGCCAACCTCTGTTATGTGC-3'
<b>p53-rev</b>	5'-CTGTCTTCCAGATACTCGGGATAC-3'
<b>SIRT1-fwd</b>	5'-GTAATGTGAGGAGTCAGCAC -3'
<b>SIRT1-rev</b>	5'-TTGGACATTACCACGTCTGC-3'
<b>TERT-fwd</b>	5'-GTTGCCCAATGCCTAGTGTGC-3'
<b>TERT-rev</b>	5'-CACTCGGCTCAACAGTAGCATC-3'
<b>TRF2-fwd</b>	5'-TGTCTGTCGCGGATTGAAGA-3'
<b>TRF2-rev</b>	5'-GCTGGAAGGTCTCATATGAA-3'

Tabelle 4: Primer für RNA-basierte Real-Time PCR-Analysen.

Basenabfolge der forward (fwd)- und reverse (rev)-Primer, Annealing-Temperatur 60°C, 40 PCR-Zyklen.

### 3.1.3.2. Primer für DNA-basierte Real-Time PCR-Analysen

Die Primer für die DNA-basierten PCR-Analysen (Tabelle 5) wurden ebenso von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, DE) bezogen:

Produkt	Sequenz
<b>18S-rRNA-fwd</b>	5'-TCAACACGGGAAACCTCAC-3'
<b>18S-rRNA-rev</b>	5'-ACCAGACAAATCGCTCCAC-3'





## 3.1.5.2. Speziell verwendete Puffer und Lösungen

**Agarosegelelektrophorese** (Kap. 3.2.6.3.1.)

50xTAE-Puffer 484 g NaCl (4,14 M); 37,2 g EDTA (64 mM);  
116 ml Eisessig (10 mM)  
ad 2000 ml mit Aqua dest.; pH 8,4 einstellen  
für den Gebrauch 1:50 mit Aqua dest. verdünnen

DNA-Ladepuffer 3 ml Glycerol; 7 ml A. dest.; 0,5 g Xylen Cyanol F

**Ficoll-basierte Dichtegradientenzentrifugation** (Kap. 3.2.3.1.1.)

Milzpuffer 50 ml 10xPBS; 5 ml FKS; 20 µl EDTA (0,5 mM)  
ad 500 µl mit Aqua dest.; steril filtrieren

**Proteinlyse und Western Blot** (Kap. 3.2.4.)

1 x Ladepuffer 2 ml Glycerol; 2 ml 10% SDS; 2,5 ml Stacking Gel  
Buffer; 3 ml Aqua dest.; Bromphenolblau für den  
Gebrauch 475 µl 1xLadepuffer mit 25 µl DTT  
mischen

10xElektrophoresepuffer 720 g Glycin; 151,5 g TRIS base; 50 g SDS  
ad 5000 ml mit Aqua dest.  
für den Gebrauch 1:10 mit Aqua dest. verdünnen

Blocking-Puffer 2,5 g Trockenmilchpulver; 50 ml 1xPBS-Tween

Proteinlysepuffer 5 ml TRIS-Puffer (1 M; pH 6.8); 20 ml 10% SDS; 10  
ml Glycerol; 15 ml Aqua dest.

Stacking Gel Buffer 6,06 g TRIS base; 4 ml 10% SDS  
ad 100 ml mit Aqua dest.; pH 6,8 einstellen

Transferpuffer 2,9 g TRIS base; 14,5 g Glycin; 200 ml Methanol  
ad 1000 ml mit Aqua dest.

TRIS-Puffer (1 M) 60,6 g TRIS base; 500 ml Aqua dest.  
pH 6,8 einstellen

TRIS-Puffer (1,5 M) 90,9 g TRIS base; 500 ml Aqua dest.  
pH 8,8 einstellen

### **Sirius Red-Färbung** (Kap. 3.2.8.2.)

0,1% Sirius Red-Lösung 0,5 g Sirius Red; 500 ml 1,2% Pikrinsäure;  
1 Woche bei Raumtemperatur reifen

1,2% Pikrinsäure 12 g Pikrinsäure; 1000 ml Aqua dest.  
pH 2,0 einstellen

## **3.1.6. Geräte, Zubehör und Verbrauchsmaterial**

### **3.1.6.1. Geräte**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Autoklav Typ 3050 EL Tuttnauer</b>	Systec (Wettenberg, DE)
<b>CCD Kamera Nikon DS-Ri1</b>	Nikon (Düsseldorf, DE)
<b>Elektrophoresekammer Wide Mini-Sub® Cell GT</b>	Bio-Rad (München, DE)
<b>Entwicklermaschine Curix 60</b>	AgfaPhoto (Leverkusen, DE)
<b>GeneGenius Bio Imaging System</b>	Syngene (Cambridge, GB)
<b>Heizblöcke</b>	
• <b>HBT-2-131</b>	Haep Labor Consult (Bovenden, DE)
• <b>Thermomixer comfort</b>	Eppendorf (Hamburg, DE)

<b>Inkubator 1000</b>	Heidolph Instruments (Schwalbach, DE)
<b>Kühlzentrifuge NAPCO 2019R</b>	Napco (Winchester, USA)
<b>LightCycler</b>	Roche (Mannheim, DE)
<b>Magnetrührer IKAMAG® RCT</b>	IKA®-Labortechnik (Staufen i. Br., DE)
<b>Mikroskope</b>	
• <b>Nikon Eclipse E600</b>	Nikon (Düsseldorf, DE)
• <b>Olympus CK2</b>	Olympus (Hamburg, DE)
<b>Mikrotom RM 2255</b>	Leica Microsystems (Nussloch, DE)
<b>pH-Meter 526</b>	WTW (Weilheim, DE)
<b>Photometer DU 730 Life Science UV/Vis</b>	Beckman Coulter (Krefeld, DE)
<b>Schüttler Polymax 1040</b>	Heidolph Instruments (Schwalbach, DE)
<b>Spektralphotometer NanoDrop 2000</b>	Peqlab (Erlangen, DE)
<b>Sterilbank HERAsafe®</b>	Heraeus (Hanau, DE)
<b>Stromquelle Agarosegelelektrophorese</b>	
• <b>Consort E831</b>	Peqlab (Erlangen, DE)
<b>Stromquellen SDS-PAGE</b>	
• <b>PowerPac 200 Power Supply</b>	Bio-Rad (München, DE)
• <b>PowerPac™ Basic</b>	Bio-Rad (München, DE)
<b>StepOnePlus™ Real-Time PCR</b>	Invitrogen (Karlsruhe, DE)
<b>Thermocycler</b>	
• <b>Px2 Thermal Cycler</b>	Thermo Fisher (Langenselbold, DE)
• <b>peqSTAR 96 Universal</b>	Peqlab (Erlangen, DE)
<b>Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell</b>	Bio-Rad (München, DE)
<b>Überkopfschüttler REAX 2</b>	Heidolph Instruments (Schwalbach, DE)
<b>Vortex-Genie® 2 G560E</b>	Scientific Industries (New York, USA)
<b>Waagen</b>	
• <b>VIC-Series Precision Balances</b>	Acculab (Göttingen, DE)
• <b>ALC-Series Analytical Balances</b>	Acculab (Acculab, DE)
<b>Zentrifugen</b>	
• <b>5415 C</b>	Eppendorf (Hamburg, DE)

• 5415 R	Eppendorf (Hamburg, DE)
• Biofuge Pico	Heraeus (Hanau, DE)
• Megafuge 1.OR	Heraeus (Hanau, DE)

Tabelle 7: Verwendete Laborgeräte.

Produkt, Hersteller.

## 3.1.6.2. Zubehör und Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
<b>Amersham Hyperfilm™ ECL</b>	GE Healthcare (Freiburg, DE)
<b>Bepanthen® Augensalbe</b>	Roche (Mannheim, DE)
<b>Cell Strainer (70 µm Nylon)</b>	BD Biosciences (Heidelberg, DE)
<b>Deckgläser</b>	VWR (Darmstadt, DE)
<b>Einbettkassetten Tissue-Tek®</b>	Sakura Finetek (Staufen i. Br., DE)
<b>Filterpapier</b>	Bio-Rad (München, DE)
<b>Hamilton-Spritze</b>	Hamilton Bonaduz (Bonaduz, CH)
<b>LightCycler® Capillaries (20 µl)</b>	Roche (Mannheim, DE)
<b>Menzel-Gläser Polysine®</b>	Thermo Fisher (Langenselbold, DE)
<b>Mini PROTEAN 3 System Glass Plates</b>	Bio-Rad (München, DE)
<b>Nitrocellulosemembran (0,2 µm)</b>	Bio-Rad (München, DE)
<b>MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate</b>	Invitrogen (Karlsruhe, DE)
<b>Optical Adhesive Covers</b>	Invitrogen (Karlsruhe, DE)
<b>Rotilabo® Magnetstäbchen</b>	Roth (Karlsruhe, DE)

Tabelle 8: Verwendetes Zubehör und Verbrauchsmaterial.

Produkt, Hersteller.

## 3.1.7. Computersoftware

Produkt	Hersteller
<b>GeneSnap v7.09</b>	Syngene (Cambridge, GB)
<b>LabChart v5.5.5</b>	ADInstruments (Spechbach, DE)

<b>LabWorks v4.6</b>	UVP (Upland, USA)
<b>LightCycler Software v3.0</b>	Roche (Mannheim, DE)
<b>NanoDrop 2000/2000C v1.4.2</b>	Peqlab (Erlangen, DE)
<b>NIS-Elements BR v3.22.10</b>	Nikon (Düsseldorf, DE)
<b>Segment v1.9 R1942</b>	Einar Heiberg, Medviso AB (Lund, SE)
<b>StepOne Software v2.0</b>	Life Technologies Corporation (Carlsbad, USA)
<b>XnView v1.91</b>	Pierre-Emmanuel Gougelet (Reims, FR)

*Tabelle 9: Verwendete Computersoftware.  
Produkt, Hersteller.*

## 3.2. Methodik

### 3.2.1. Tiermodelle

#### 3.2.1.1. Versuchstiere und Tierhaltung

Die Tierversuche wurden durch das Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz (Saarbrücken, DE) genehmigt (Genehmigungsnummer 02/2012) und im Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin III an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes durchgeführt. Bei den Versuchstieren handelte es sich ausschließlich um männliche, durchschnittlich 10 bis 14 Wochen alte C57Bl/6N-WT-Mäuse, welche aus eigener Zucht aus dem Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes stammten. Zudem wurden 11 bis 34 Wochen alte Telomerase-Reverse-Transkriptase-Knockout ( $TERT^{-/-}$ )-Mäuse (B6.129S-TERT<sup>tm1Yjc/N</sup>) und  $TERT^{+/-}$ -WT-Kontrollen, welche von der Arbeitsgemeinschaft Prof. Judith Haendeler (Institut für Umweltmedizinische Forschung, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, DE) bereitgestellt wurden, untersucht. Die  $TERT^{-/-}$ -Tiere sind ein Modell für beschleunigte Alterung durch Telomerverkürzung mit der Folge einer zunehmenden „replikativen“ Seneszenz der Stammzellen von Generation zu Generation. Ziel dieser Arbeit war es aber nicht, Tiere mit kurzen Telomeren zu untersuchen, sondern fokussiert zu untersuchen, was die Rolle einer inaktiven TERT in der Signaltransduktion ist. Daher wurden ausschließlich Tiere der 2. Filialgeneration

verwendet, die noch eine erhaltene Telomerlänge haben. Der Progerie-Phänotyp tritt erst ab der 4.-5. Kreuzungsgeneration auf. Es werden jeweils heterozygote Tiere (TERT-/+ ) verpaart und alle Mäuse eines Wurfs genotypisiert. Homozygote Tiere werden noch einmal miteinander verpaart, bevor das Experiment stattfindet. Die Mäuse wurden in artgerechter Weise in normierten Makrolonkäfigen alleine oder in Gruppen von bis zu 6 Mäusen gehalten mit stets freiem Zugang zu Trockenfutter in Form pelletierter Nager-Standarddiät (ssniff, Soest, DE) und zu Trinkwasser. Durch ein automatisches Beleuchtungsprogramm wurden die Tiere in den fensterlosen Räumen Hell-Dunkel-Phasen von jeweils 12 Stunden bei einer Klimatisierung von 20 bis 23°C sowie einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 bis 55% ausgesetzt. Zur eindeutigen Identifizierung der einzelnen Mäuse wurden deren Ohren einem bestimmten Schema entsprechend mittels Lochzange markiert.

### 3.2.1.2. Kardiovaskuläres Schadensmodel im tierexperimentellen Versuch

#### 3.2.1.2.1. Operationstechnik zur Induktion eines Myokardinfarkts

Zunächst erfolgte die Narkose der Tiere mittels Ketavet® und Rompun®. Dazu wurde eine 2:1 Mischung aus Ketaminhydrochlorid (100 mg/kg Körpergewicht (KG)) zur Analgosedierung und aus Xylazinhydrochlorid (10 mg/kg KG) zur Muskelrelaxation in einer 1:10-Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung eingesetzt. Für die Eingriffe wurden 0,3 ml der Narkose pro 20 g KG intraperitoneal appliziert. Zur Verhinderung einer Austrocknung der Kornea wurden die Augen prophylaktisch mit einer Bepanthen®-Salbe geschützt. Die Mäuse wurden nach ausreichender Narkosetiefe mittels Fadenschlinge um die Schneidezähne fixiert und unter Sicht auf die Glottis (*Abbildung 2 a*) orotracheal intubiert. Im Anschluss wurden sie auf einer gewärmten Glasplatte in Rückenlage flach positioniert und mit Klebestreifen fixiert. Zur Atemwegssicherung wurde der Tubus (eigene Herstellung aus einer 22-Gauge-Venenverweilkanüle (Venflon™ Pro Safety, Becton Dickinson, Heidelberg, DE)) und eine 18-Gauge-Kanüle (100 Sterican®, B.Braun, Melsungen, DE) mit einem Beatmungsgerät (MiniVent Typ 845, Hugo Sachs Elektronik, March, DE) verbunden und ein Tidalvolumen von 200 µl Raumluft sowie eine Atemfrequenz von 120/min eingestellt. Die Mäuse konnten anschließend unter semisterilen Arbeitsbedingungen operiert werden. Der Zugang fand nach Hautrasur und -desinfektion über einen links

parasternalen Hautschnitt statt. Nachfolgend wurden die *Musculi pectorales* (*Abbildung 2 b*) und *intercostales* stumpf durchtrennt, sodass sich ein OP-Fenster zwischen der dritten und vierte Rippe erschloss. Danach wurde mittels Fadenzug das Blickfeld vergrößert, das Perikard eröffnet und die LAD aufgesucht. Aufgrund der anatomischen Gegebenheit, dass die LAD nicht ganz oberflächlich verläuft, musste an vermuteter Position im Bereich proximal des linken Vorhofs ein Umschlingen des Myokards mittels Fadenschlinge (Perma-Hand Seide, 6-0, 3/8 c, Ethicon, Norderstedt, DE) erfolgen (*Abbildung 2 c*). Danach wurde das umschlungene Gewebe mit Hilfe zweier Knoten permanent ligiert (*Abbildung 2 d*). Der Erfolg der Ligatur konnte durch das Abblassen des distal des Knotens gelegenen LAD-versorgten Myokards überprüft werden. Im Anschluss wurde der Interkostalraum mit Hilfe der Fixierfäden geschlossen, die Muskulatur zugenäht und der Hautschnitt mittels Einzelknopfnähten verschlossen. Zur Behandlung postoperativer Schmerzen wurden jeder Maus 5 mg Rimadyl®, entsprechend 0,1 ml Injektionslösung, intraperitoneal appliziert.

Bei den Kontrolltieren erfolgten, im Rahmen einer Scheinoperation (Sham-Operation), lediglich die Injektionsnarkose, die Intubation, der operative Zugang sowie das Darstellen der LAD ohne anschließende dauerhafte Ligatur der beschriebenen Koronararterie vor Wiederverschluss des Thorax' und der Haut.

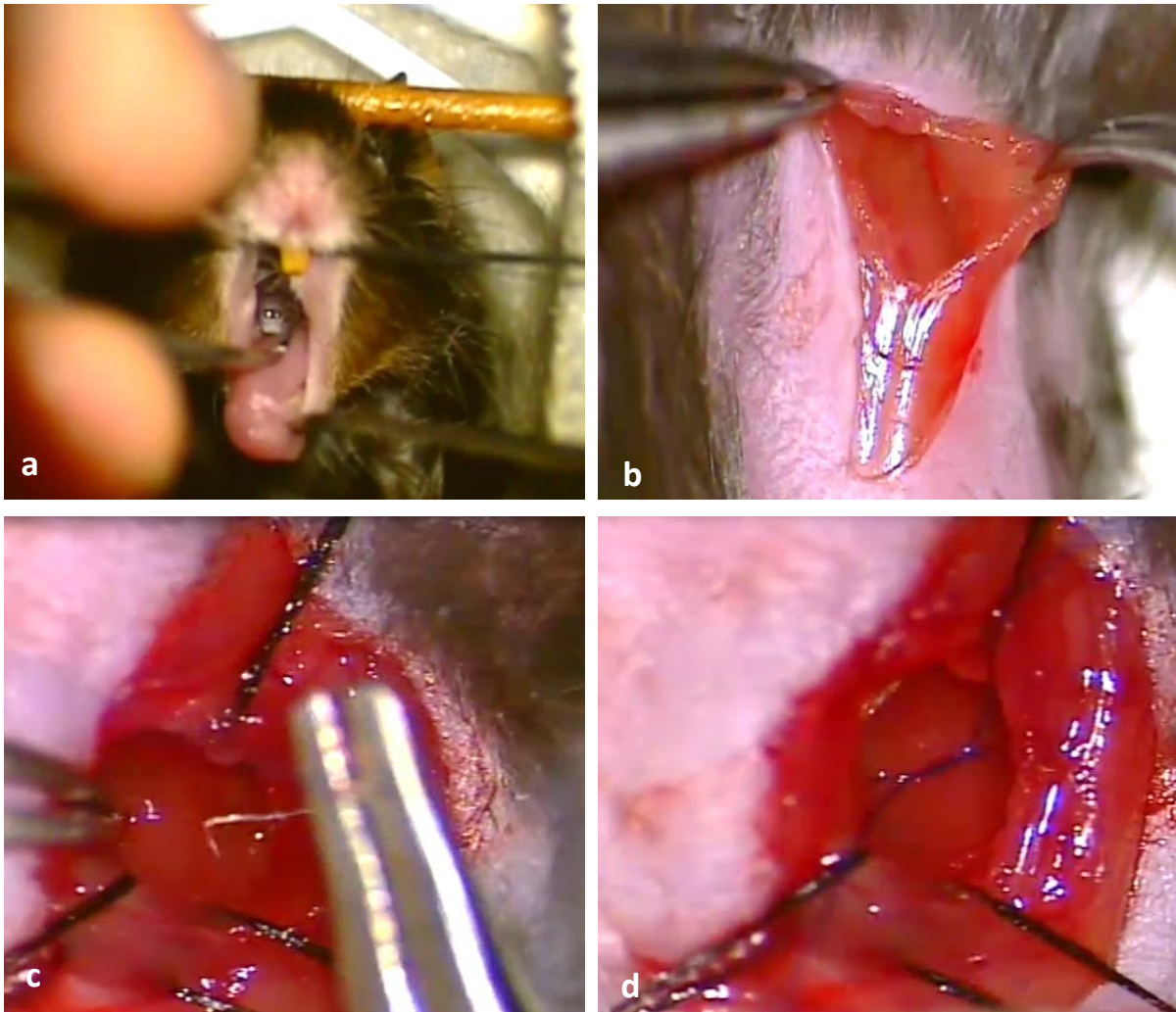


Abbildung 2: Zur Sicherung der Atemwege wurden die narkotisierten Mäuse unter Sicht auf die geöffnete Stimmritze orotracheal intubiert (a). Nach dem links parasternalem Hautschnitt wurden die Musculi pectorales stumpf durchtrennt (b), um sich über den 3. Interkostalraum einen Zugang zur LAD zu verschaffen. Mittels Fadenschlinge wurde das Vorderwandmyokard proximal des linken Vorhofes durchstoßen (c) und die LAD mittels Knoten permanent ligiert (d). LAD: left anterior descending.

### 3.2.2. *In vivo*-Analysen

#### 3.2.2.1. Magnetresonanztomographie

Um bei den LAD-ligierten Mäusen funktionelle und morphologische Veränderungen am Herzen *in vivo* zu charakterisieren und mit den Sham- sowie den beiden TERT-Mauslinien zu vergleichen, wurde ein Kleintier-MRT mit einer Magnetfeldstärke von 9,4 Tesla eingesetzt (Biospec advanced II 94/20, Bruker BioSpin, Ettlingen, DE). Die Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie der Universität des Saarlandes. Dieses nicht-invasive



Verfahren erlaubte es, volumetrische Analysen zur Diagnostik der linksventrikulären Funktionen heranzuziehen sowie das Ausmaß des infarzierten Areal, durch Detektion von Myokardausdünnungen mit regionalen Wandbewegungsstörungen, zu bewerten. Vor Messbeginn erfolgte die Inhalationsnarkose in einer Kammer mit 2-3% Isofluran gemischt mit 100% Sauerstoff bei einer Flussrate von 1,0 l/min. Die Maus wurde anschließend auf der Oberflächenspule positioniert und mit Klebestreifen fixiert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte die weitere kontinuierliche Inhalation von 1,0-1,5% Isofluran gemischt mit 100% Sauerstoff (1,0 l/min) über eine Nasenmaske. Zur Registrierung der Atemfrequenz und zur Minimierung atemabhängiger Artefakte wurde ein Drucksensor (*Graseby infant respiration sensor*, Smith Medical Germany, Grasbrunn, DE) angelegt. Zusätzlich wurden Elektrokardiografie(EKG)-Elektroden (*NY3M Red Dot neonatal monitoring electrodes*, 3M Health Care, St. Paul, USA) angebracht und mit einem externen EKG (*SA Instruments Inc.*, Stony Brook, USA) verbunden. Pro Maus wurden mehrere Projektionen (Übersichtsaufnahmen, Referenzscans in 3 Ebenen, Längs- und Kurzachsenblicke) aufgenommen (*vgl. exemplarisch Abbildung 3 a-c*). Um den gesamten Ventrikel von der Herzspitze bis zur Klappenebene darzustellen war die Akquisition von 6 bis 7 Schichten erforderlich. Unter Verwendung der Computersoftware *Segment* wurden nach Definition der Enddiastole (maximales ventrikuläres Binnenvolumen) und der Endsystole (minimales ventrikuläres Binnenvolumen) in jeder Schicht das Endo- und Epikard mittels ROI-Werkzeug, unter Aussparung der Papillarmuskeln, manuell konturiert (*Abbildung 3 b und c*). So wurde das linksventrikuläre Querschnittslumen als die vom Endokard umschlossene Pixelzahl bestimmt.

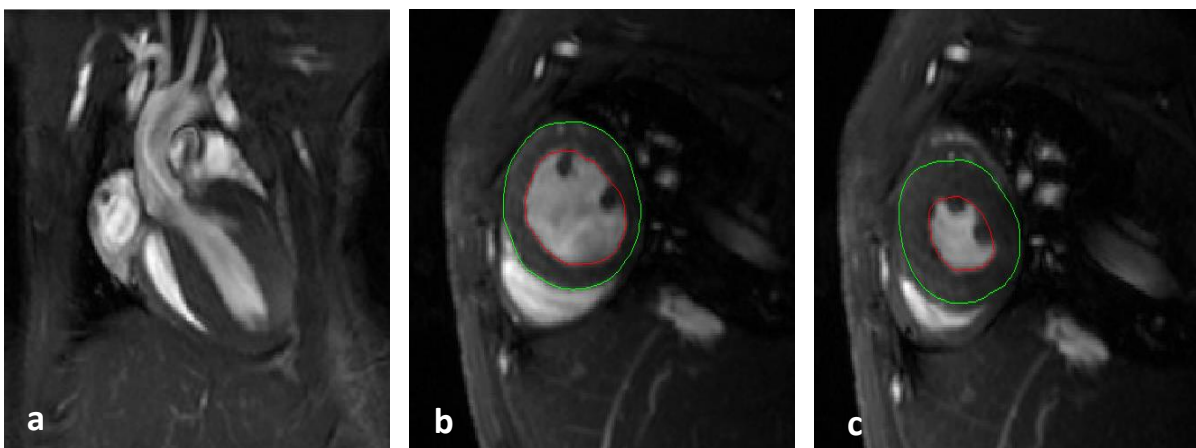


Abbildung 3: Parakoronarer Längsachsenblick (a) und mittventrikuläre Kurzachsenblicke (b,c) in bSSFP-Sequenz (*bright blood*) einer scheinoperierten Wildtypmaus mit semiautomatischer Funktionsanalyse durch Konturierung des Endo- (rot) und Epikards (grün) in Enddiastole (b) und Endsystole (c). bSSFP: *balanced steady-state free precession*.

Unter Berücksichtigung der Schichtdicke ( $d=1\text{mm}$ ) wurden anhand der planimetrisch bestimmten endokardialen Fläche ( $A_{\text{endo}}$ ) die jeweiligen Teilvolumina ( $V_{\text{teil}}$ ) ermittelt und durch Summation über alle 6 bis 7 Schichten das Gesamtvolumen ( $V_{\text{gesamt}}$ ) entsprechend der Formel  $V_{\text{gesamt}} = \sum V_{\text{teil}} = \sum A_{\text{endo}} * d$  durch die Software berechnet. Somit konnten das linksventrikuläre enddiastolische (LVEDV) und endsystolische Volumen (LVESV), das Schlagvolumen (SV) und die Ejektionsfraktion (EF) gemessen werden. Unter Einbeziehung der im EKG ermittelten Herzfrequenz konnten zusätzlich das Herzzeitvolumen (HZV) sowie unter Berücksichtigung des Gewichts des Versuchstieres der kardiale Index (KI) berechnet werden. Die softwaregestützte Ermittlung der linksventrikulären Masse (LVM) erfolgte mittels Differenzbildung zwischen endo- und epikardialen Radius in Enddiastole. Zur Qualitätskontrolle der ermittelten Werte wurden in den Kurzachsenprojektionen die jeweiligen diagonal gemessenen linksventrikulär endsystolischen (LVESD) und enddiastolischen Diameter (LVEDD) mit Hilfe des Lineal-Werkzeugs ermittelt. Anhand derer konnten das LVESV, das LVEDV und die EF mittels Teichholzformel berechnet werden:

$$LVESV = \frac{7}{2,4 + LVESD} * (LVESD)^3$$

$$LVEDV = \frac{7}{2,4 + LVEDD} * (LVEDD)^3$$

$$EF = \frac{LVEDV - LVESV}{LVEDV} * 100$$

### 3.2.2.2. Intrakardiale Druckmessung

Um die linksventrikuläre Druckentwicklung *in vivo* zu bestimmen, wurde ein Druckmesskatheter mit einem Außendurchmesser von 1,4 French (*Mikro-Tip Catheter*, Millar Instruments, Houston, USA) im linken Ventrikel positioniert. Dazu wurden die Versuchstiere, bis einschließlich der stumpfen Durchtrennung der *Musculi pectorales* und *intercostales*, wie in Kap. 3.2.1.2.1. behandelt. Über diesen Zugang wurde, nach Eröffnung des Perikards, der Mikrokatheter mittels einer 24-Gauge-Kanüle (100 Sterican®, B.Braun, Melsungen, DE) durch das Myokard der Herzspitze in den linken Ventrikel vorgeschoben. Mit Hilfe eines daran angeschlossenen Druckwandlers (*SPR 671*, Millar Instruments, Houston, USA) und eines Messverstärkers (*BioAmp-04/8*, Föhr Med. Instruments, Seeheim/Ober-Beerbach, DE) konnten so die

linksventrikulären Druckwerte gemessen werden. Sobald die Messwerte stabil waren und eine kontinuierliche Druckkurve ohne Artefakte auf dem Monitor sichtbar wurde, wurden die Drücke drei Minuten lang mit der Software LabChart aufgezeichnet. Im Anschluss fand die schmerzlose Tötung der Tiere und die Organentnahme statt (Kap. 3.2.2.3.). Die nachfolgend aufgeführten Parameter wurden bei der Auswertung der akquirierten Daten berücksichtigt: Herzfrequenz (HF), maximaler, mittlerer und minimaler Druck des LV, linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP) und maximale Druckanstiegs- bzw. Druckabfallsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{max}$  bzw.  $dP/dt_{min}$ ); wobei  $dP/dt_{max}$  als Maß für die Kontraktilität und  $dP/dt_{min}$  als Maß für die Relaxationsfähigkeit des Ventrikels gilt.

### 3.2.2.3. Schmerzlose Tötung der Versuchstiere und Organentnahme

Die Versuchstiere wurden zunächst gewogen und erhielten pro 20 g KG eine intraperitoneale Injektion von 0,3 ml eines unverdünnten Ketavet®/Rompun®-Narkosegemischs im Verhältnis 2:1. Unmittelbar nach Eintritt des Todes, gekennzeichnet durch Ausfall der Zwischenzehenreflexe und Beenden der eingesetzten Schnappatmung, wurde das Abdomen durch einen Schnitt vom Unterbauch bis zum Xiphoid eröffnet. Für die Isolation von MNC wurde die Milz explantiert und bis zum weiteren Vorgehen (Kap. 3.2.3.1.) in gekühltem Milzpuffer aufbewahrt. Weiterhin wurden die Leber und die Nieren entnommen und feucht gewogen. Nachfolgend wurde der Thorax mittels Sternotomie eröffnet, das explantierte Herz gewogen und die beiden Atrien entfernt. Das weitere Vorgehen war wie folgt: zunächst wurde mit einer Gewebescherer das Areal um den OP-Knoten abgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Dieses Areal entsprach der IZ, welche aufgrund der ischämisch bedingt blässeren Farbe meist gut erkennbar war. Anschließend wurde eine Gewebescheibe von der dazugehörigen RZ abgetrennt und ebenso aufbewahrt. Bei den Sham-Tieren hingegen wurden ein Teil der Vorderwand (VW) und das dazugehörige Randgebiet entnommen. Im Anschluss wurden die proximale Aorta, die Leber sowie die Lunge explantiert und gewogen. Die Tibialänge wurde nach Amputation des linken Hinterbeins mit einem Lineal ausgemessen und das Verhältnis des Herzgewichts zur Tibialänge bestimmt. Die Indices Herzgewicht zu Tibialänge bzw. Herzgewicht zu KG geben einen Hinweis darauf, ob eine Myokardhypertrophie besteht. Die explantierten Organe wurden für

molekularbiologische Methoden bis zur weiteren Aufbereitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgekühlt, für histologische Analysen wurden die Gewebe zur Fixierung in einer 4%igen 1x *phosphate buffered saline* (PBS)-gepufferten Formaldehyd-Lösung bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.2.3. *In vitro*-Analysen

#### 3.2.3.1. Methoden zur Zellisolation

In der vorliegenden Arbeit wurden MNC aus den Milzen der Versuchstiere extrahiert. Unter MNC versteht man eine heterogene Mischung aus Monozyten, Lymphozyten, Progenitorzellen und Resten von Granulozyten. Die Trennung der MNC von den übrigen Zelltypen der roten Milzpulpa erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Trennlösung.

##### 3.2.3.1.1. Ficoll-basierte Dichtegradientenzentrifugation zur Isolation von MNC

Der gesamte Versuchsablauf wurde unter sterilen Bedingungen in einer Sterilwerkbank durchgeführt. Nach Organentnahme (Kap. 3.2.2.3.) wurde die Milz in eine Zellkulturschale mit 10 ml Milzpuffer überführt. Mit einer Kanüle wurde das restliche Fettgewebe sorgfältig abgetrennt und das Organ in eine zweite Schale mit 10 ml Milzpuffer gelegt. Die Kapsel wurde angeritzt und die rote Pulpa fein säuberlich ausgepresst. Die weiße bindegewebige Milzpulpa wurde entsorgt. Zur Homogenisierung wurden die roten Pulpabrocken mehrfach durch eine 10 ml-Spritze gezogen und durch einen Zellfilter mit  $70\ \mu\text{m}$  Porengröße gesiebt. Die Falcons mit den in Milzpuffer gelösten Zellen wurden mit 1xPBS auf 35 ml aufgefüllt und anschließend auf 15 ml Ficoll-Trennlösung vorsichtig überschichtet. Durch Zentrifugation (20 min; 2400 rpm ohne Bremse) wurden die MNC von den übrigen Zelltypen über den Ficoll-Dichtegradienten getrennt (*Abbildung 4*).

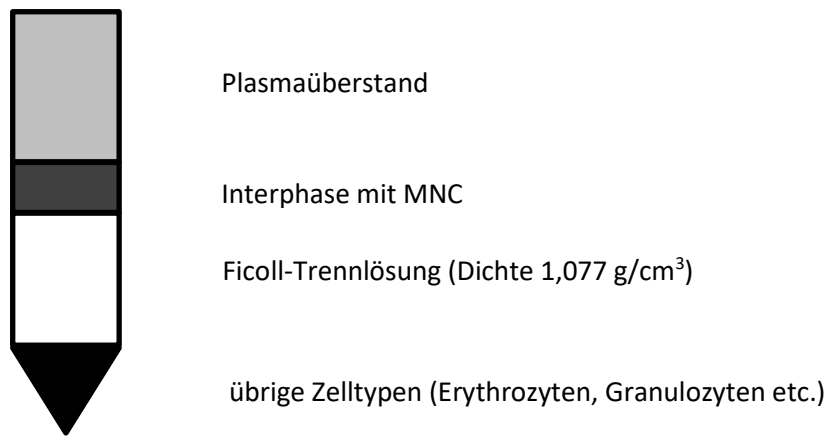


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Phasentrennung nach Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Trennlösung zur Isolation von MNC. MNC: mononukleäre Zellen.

Die Interphase mit den MNC wurde in einen neuen Falcon überführt, auf 50 ml mit 1xPBS gefüllt und zentrifugiert (10 min; 2400 rpm mit Bremse). Nach Abgießen des Überstands wurde das Pellet in 3 ml 1xPBS gründlich resuspendiert.

#### 3.2.3.1.1.1. Zellzahlbestimmung

Die Anzahl der isolierten MNC wurde in einer Neubauer-Zählkammer unter einem Phasenkontrastmikroskop bestimmt. Auf die Zählkammer wurde ein mit Atemluft angefeuchtetes Deckglas geschoben, sodass Newton'sche Ringe sichtbar wurden. Anschließend wurden 20 µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Türks-Lösung angefärbt und in die entsprechende Vorrichtung pipettiert. Durch diesen Farbstoff wurden die Leukozyten angefärbt und konnten manuell gezählt werden. Es wurde stets darauf geachtet, dass die Zellzahl nicht über 100 Zellen pro großem Quadrat liegt. Andernfalls wurde die Suspension im Verhältnis 1:10 mit 1xPBS verdünnt. Im Zählgitter wurde jeweils das große Quadrat rechts oben sowie dessen obere und linke Begrenzungslinie ausgezählt. Die ermittelte Zellzahl wurde mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor sowie mit  $10^4$  aufgrund des vorgegebenen Volumens der Quadrate multipliziert. Das errechnete Endergebnis entsprach der Zellzahl pro ml Suspensionsvolumen.

### 3.2.3.1.1.2. Aufteilung der Gesamtsuspension

Für die weiteren geplanten Experimente wurde die Gesamtsuspension wie folgt aufgeteilt: Jeweils  $1 \times 10^6$  MNC für die Cholanidopropyldimethylammonio-propansulfonat(CHAPS)- (Kap. 3.2.7.1.) und DNA-Isolation (Kap.3.2.6.1.),  $5 \times 10^6$  für die RNA-Isolation (Kap. 3.2.5.2.) und die restlichen MNC, im Durchschnitt 10 bis  $20 \times 10^6$ , für die Proteinisolation (Kap. 3.2.4.2.).

## 3.2.4. Methoden zur Analyse von Proteinen

Um die Expression telomerstabilisierender sowie apoptose- und zellzyklusregulierender Proteine zu detektieren, wurde das Western-Blot-Verfahren durchgeführt. Dazu wurden die isolierten Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt, elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran geblottet, mittels Immundetektion nachgewiesen und anschließend densitometrisch quantifiziert.

### 3.2.4.1. Proteinisolation aus Gewebe

In der vorliegenden Arbeit wurden Proteine aus Aorta, Leber und Myokard (IZ und RZ) isoliert. Vom schockgefrorenen Organ wurde ein ca.  $2 \times 2$  mm kleines Stück abgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Hinzu wurde ein Gemisch aus 300  $\mu$ l Proteinlysepuffer und Proteaseinhibitoren (1  $\mu$ l Leupeptin, 1  $\mu$ l PMSF sowie 0,59  $\mu$ l Aprotinin (1,7 mg Protein/ml) pro ml Lysepuffer) pipettiert. Anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe eines Potter-Homogenisators lysiert und zur Denaturierung 5 min bei 95°C erhitzt.

### 3.2.4.2. Proteinisolation aus MNC

Die Proben mit den extrahierten MNC (Kap. 3.2.3.1.2.) wurden zunächst zentrifugiert (10 min; 3000 rpm). Im Anschluss wurde der Überstand abpipettiert und die Zellpellets in 100  $\mu$ l Proteinlysepuffer resuspendiert. Die homogenisierte Lösung wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 5 min bei 95°C in einem Heizblock erhitzt und bis zur weiteren Analyse bei -20°C aufbewahrt.

### 3.2.4.3. Photometrische Konzentrationsbestimmung nach Lowry

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Proteine erfolgte nach der kolorimetrischen Methode nach Lowry [130] mittels DC™ Protein Assay Reagent. Zunächst wurden 2 µl der Probe im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. Im Anschluss wurden 100 µl des Reagenz A (alkalische Kupfertartratlösung) und 800 µl des Reagenz B (Folin-Reagenz) hinzupipettiert, wodurch nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur ein Farbumschlag der Lösung von gelb zu blau erfolgte. Die Intensität dieser Farbreaktion ist abhängig von der Proteinkonzentration, welche photometrisch bei 540 nm gemessen wurde. Als Referenzwert wurde mit den Reagenzien versetztes Aqua dest. benutzt. Zur Kalibrierung diente eine Standardkurve mit bovinem Serumalbumin in einem Konzentrationsbereich von 100 bis 1000 µg/ml.

### 3.2.4.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einer Matrix aus Gel in einem elektrischen Feld. Das Prinzip beruht darauf, dass eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und der elektrophoretischen Mobilität eines Polypeptids besteht; kleinere Moleküle wandern also schneller als größere von der Anode zur Kathode. Zur Herstellung der Trägermatrix wurde ein Polyacrylamidgel (*Tabelle 10*) gegossen und aushärten gelassen.

Gelkomponente	Trenngel 10%	Trenngel 12%	Sammelgel 5%
<b>1,5 M TRIS-Puffer (pH 8,8)</b>	5,0 ml	5,0 ml	-
<b>1 M TRIS-Puffer (pH 6,8)</b>	-	-	0,63 ml
<b>30% Acrylamid/Bis Solution</b>	6,7 ml	8,0 ml	0,83 ml
<b>Aqua dest.</b>	7,9 ml	6,6 ml	3,40 ml
<b>10% SDS</b>	0,2 ml	0,2 ml	0,05 ml
<b>10% APS</b>	0,2 ml	0,2 ml	0,05 ml
<b>TEMED</b>	0,008 ml	0,008 ml	0,005 ml

*Tabelle 10: Zusammensetzung des Polyacrylamidgels.*

*Gelkomponente, 10%iges Trenngel für TRF2, Chk2, Akt, pAkt, p53 und GAPDH,  
12%iges Trenngel für p16, Bax und Bcl2, 5%iges Sammelgel.*

Die Konzentration von Acrylamid und Bisacrylamid bestimmte die Porengröße des Gels, welche für den Molekularsiebeffekt verantwortlich war. Die Polymerisation des Polyacrylamids wurde durch APS initiiert, als Katalysator diente TEMED. 50 µg Proteinmenge wurden mit 1xLadepuffer sowie mit DTT, zur Spaltung von Disulfidbrücken, im Verhältnis 1:1 versetzt und 7 min bei 70 °C erhitzt. Die Proben wurden anschließend im Sammelgel aufgetragen. Die Proteine bildeten mit dem im Gel enthaltenen SDS negativ geladene Komplexe mit konstanter Masse zum Ladungsverhältnis aus, sodass die ursprüngliche Ladung vernachlässigbar wurde. Die Wanderung der Proben im Trenngel, umgeben von 10xElektrophoresepuffer, fand in einer Elektrophoresekammer in einem elektrischen Feld (30 mA) statt.

#### 3.2.4.5. Proteintransfer nach dem Semi-Dry-Verfahren

Zum Blotten wurden Filterpapier, eine Nitrocellulosemembran mit einer Porengröße von 2 µm, das Gel und ein weiteres Filterpapier übereinandergestapelt. Zuvor wurden diese in Transferpuffer kurz eingeweicht. Vorhandene Luftblasen wurden aus dem Stapel entfernt und die Blottingkammer bei einer Stromstärke von 100 mA für 45 min erneut in ein elektrisches Feld gebracht. Die der Größe nach aufgetrennten Proteine wurden so vom Trenngel auf die Trägermembran transferiert.

#### 3.2.4.6. Immundetektion

Zunächst wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran mittels Milchpulver (5%ige Trockenmilchlösung; 30 min bei Raumtemperatur) abgesättigt. Die darauffolgende Bindung des Primärantikörpers (siehe 3.1.2.1) fand in 5 ml 1%iger Trockenmilchlösung statt. Die Membran wurde in dieser Lösung in einem Kühlraum bei 4 °C über Nacht auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Überschüssige, unspezifisch gebundene Antikörper wurden am Folgetag durch dreimaliges Waschen mit 1xPBS-Tween entfernt und die Membran in einer Lösung mit Peroxidasegekoppeltem Sekundärantikörper (anti-Maus IgG-Peroxidase 1:5000 bzw. anti-Kaninchen IgG-Peroxidase 1:4000 verdünnt in 1xPBS) für 30 bzw. 20 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1xPBS-Tween zur Entfernung von überschüssigem Sekundärantikörper wurde die Membran in 4 ml *ECL™ Western Blotting Detection-Lösung* (Reagenzien 1 und 2 im Verhältnis 1:1) für 1 min inkubiert. Die an den



Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase oxidierte das in der Detektionslösung enthaltene Luminol und katalysierte die Reduktion von  $H_2O_2$ . Die so entstandene Lichtemission wurde dann auf einen *ECL™-Autoradiographiefilm* übertragen, indem er, für die jeweils notwendige Zeit, in einer Entwicklerkassette damit exponiert wurde. Schließlich wurde der Film maschinell entwickelt und fixiert.

#### 3.2.4.7. Densitometrische Quantifizierung

Zunächst wurde der Film eingescannt und die detektierten Proteine anhand des auf jedem Gel mitgelaufenen Molekulargewichtstandards (*prestained low range marker*) identifiziert. Die optische Dichte (OD) der Proteinbanden wurde mit Hilfe der Computersoftware *Labworks 3.0* ermittelt. Zur Quantifizierung der Proteine wurde die gemessene OD des untersuchten Proteins einer bestimmten Probe jeweils durch die OD des als Referenz gewählten *housekeeping*-Proteins (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, GAPDH) der betreffenden Probe dividiert und gegen die relative Expression des Proteins in der Kontrollgruppe normalisiert.

### 3.2.5. Methoden zur Analyse von RNA

Zur Genexpressionsanalyse wurden die nachfolgenden Techniken angewandt. Diese erlauben sowohl eine semiquantitative als auch eine quantitative Analyse der Expression einzelner Gene.

#### 3.2.5.1. RNA-Isolation aus Gewebe

Das Protokoll wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Zunächst wurde ein kleines Gewebestück von den tiefgefrorenen Organen auf Trockeneis abgetrennt und in einem Reaktionsgefäß mit 1 ml *peqGOLD RNA Pure™*, einer einphasigen Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, mit dem Potter-Homogenisator unter dem Abzug lysiert. Um eine Trennung von Nukleinsäuren und Proteinen zu gewährleisten wurden dem Lysat 300 µl Chloroform hinzugefügt. Die Probe wurde danach auf einem Vortexer gemischt, bis eine trübe Lösung entstand, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (4 °C; 30 min; 14.000 U/min). Es bildete sich

so eine Phasentrennung aus, wobei die obere wässrige Phase aus RNA bestand. Diese wurde in ein neues Reaktionsgefäß, in welchem 400 µl eisgekühltes Isopropanol vorgelegt waren, überführt. Zur Optimierung der RNA-Ausfällung wurde das Gemisch über Nacht bei 4°C gelagert. Am Folgetag wurde der Isolationsvorgang durch erneutes Zentrifugieren (4°C; 60 min; 14.000 U/min) fortgesetzt. Danach wurde der Überstand abpipettiert und 800 µl eisgekühltes 70%iges Ethanol (35 ml 100% Ethanol; 15 ml RNase-depletiertes DEPC-H<sub>2</sub>O) hinzupipettiert. Nach erneuter Zentrifugation (4°C; 15 min; 14.000 U/min) bildete sich ein RNA-Pellet, welches nach Abnahme des Überstands und Trocknen unter dem Abzug in 20 bis 30 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gründlich resuspendiert wurde. Das Isolat wurde anschließend bei 65 °C für 5 min erhitzt und bei -20°C gelagert.

#### 3.2.5.2. RNA-Isolation aus MNC

Das für  $5 \times 10^6$  MNC berechnete Suspensionsvolumen (Kap.3.2.3.1.2.) wurde zunächst 10 min mit 3000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und die Zellpellets in 1 ml peqGOLD RNA Pure™ resuspendiert. Das weitere Vorgehen entsprach dem wie in Kap. 3.2.4.1.

#### 3.2.5.3. Photometrische Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgte durch Messung am Spektralphotometer *NanoDrop 2000*. Anhand der OD<sub>260</sub>, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, sowie der OD<sub>280</sub>, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, wurde der Quotient OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> herangezogen, um Rückschlüsse über den Reinheitsgrad der Gesamt-RNA in der Probe zu schließen. Je näher das Verhältnis bei 2,0 lag, desto reiner war die RNA; lag der Wert darunter, so war die Probe mit Proteinen oder anderen Molekülen kontaminiert. Als Referenzwert diente Aqua dest..

#### 3.2.5.4. Synthese komplementärer DNA aus Gewebe- und MNC-RNA

Die reverse Transkription der RNA in komplementäre DNA-Stränge diente in der anschließend durchgeführten PCR als Template (Kap. 3.2.6.3.). Das erforderliche

RNA-Volumen wurde aus der benötigten RNA-Menge (2 µg) und der spektralphotometrisch gemessenen RNA-Konzentration bestimmt. Das Volumen wurde anschließend mit DEPC-H<sub>2</sub>O so verdünnt, dass man ein Reaktionsvolumen von 10 µl pro Ansatz erhielt. Zur Herstellung des PCR-Ansatzes (*Tabelle 11*) wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* verwendet und die äquivalenten Mastermix-Volumina (10 µl/Ansatz) zu den RNA-Reaktionsvolumina pipettiert.

Komponente	Volumen/Ansatz
<b>10x RT Buffer</b>	2,0 µl
<b>25x dNTP Mix (100 mM)</b>	0,8 µl
<b>10x RT Random Primer</b>	2,0 µl
<b>MultiScribe™ Reverse Transcriptase</b>	1,0 µl
<b>RNasin® Ribonuclease Inhibitor</b>	1,0 µl
<b>DEPC-H<sub>2</sub>O</b>	3,2 µl

*Tabelle 11: Zusammensetzung des Mastermix zur cDNA-Synthese.  
Komponente und Volumen pro Ansatz.*

Gemäß dem in *Tabelle 12* aufgeführten Protokoll erfolgte die reverse Transkription der RNA zu cDNA innerhalb eines Thermocyclers.

Inkubationszeit	Temperatur
<b>10 min</b>	25°C
<b>120 min</b>	37°C
<b>5 min</b>	85°C
∞	4°C

*Tabelle 12: Protokoll zur cDNA-Synthese.  
Inkubationszeit und Temperatur.*

### 3.2.6. Methoden zur Analyse von DNA und cDNA

Zur Telomerlängenmessung isolierter DNA sowie zur Analyse der Genexpression mittels reverser Transkription generierter cDNA-Sequenzen wurden die nachfolgenden Techniken durchgeführt.

### 3.2.6.1. DNA-Isolation aus Gewebe und MNC

Mit Hilfe des *QIAamp® DNA Mini Kit* wurde die genomische DNA aus organischem Gewebe sowie aus MNC isoliert. Das Protokoll wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

### 3.2.6.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA

Die photometrische Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA erfolgte wie in Kap. 3.2.5.3. mittels Messung am Spektralphotometer *NanoDrop 2000*.

### 3.2.6.3. Quantitative Real-Time-PCR mit interkalierendem Farbstoff

Bei der PCR handelt es sich um ein von Kary Mullis im Jahr 1984 entwickeltes, molekularbiologisches Standardverfahren zur *in vitro*-Vervielfältigung von spezifischen DNA- bzw. cDNA-Sequenzen. Die Primersequenzen sind in *Tabelle 4 & 5* aufgeführt. Bei der konventionellen PCR wird im Thermocycler der cDNA-Doppelstrang mittels thermischer Denaturierung bei 95°C in zwei Einzelstränge getrennt. Im nächsten Reaktionsschritt folgt die Hybridisierung der Primer an die einzelsträngige cDNA bei 55 bis 60°C Annealing-Temperatur. Diese Startermoleküle sind entweder komplementär zur Anfangssequenz des (+)-Stranges (5') (*forward*-Primer) oder zur Anfangssequenz des (-)-Stranges (3') (*reverse*-Primer) der untersuchten cDNA-Sequenz. Im Anschluss erfolgt bei 72°C die eigentliche Elongation der cDNA-Matrize durch eine hitzestabile Taq-DNA-Polymerase. Das Enzym nutzt die im Mastermix enthaltenen Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP), damit die freien DNA-Stränge mit Nukleotiden aufgefüllt werden können. Das entscheidende Prinzip besteht in der zyklischen Wiederholung dieser drei Reaktionsschritte, wodurch die cDNA-Matrize exponentiell vervielfältigt wird. Die Methode ist sehr empfindlich. Um eine mögliche Fehlerquelle durch Kontamination mit fremder DNA zu verhindern, wird eine Negativkontrolle mit *Aqua inieciabilia* mit einbezogen. Außerdem erfolgen immer Doppel- oder Dreifachbestimmungen.

Die quantitative *Real-Time* (qRT)-PCR beruht auf dem Prinzip des herkömmlichen PCR-Verfahrens, erlaubt aber zusätzlich die Quantifizierung der resultierenden Amplifikate. Die Intensität der durch SYBR® Green hervorgerufenen

Fluoreszenzemissionen, welche während der PCR-Zyklen in Echtzeit detektiert werden, korreliert mit der Menge der generierten Amplifikate. Der Verlauf einer qRT-PCR besteht aus einer linearen, einer exponentiellen und schließlich einer Plateau-Phase. Lediglich in der exponentiellen Phase herrschen optimale Reaktionsbedingungen, welche eine quantifizierbare Amplifikation der DNA bzw. cDNA erlauben.

### 3.2.6.3.1. Telomerlängenmessung mittels qRT-PCR

Um die Telomerlänge zu erfassen, wurde eine qRT-PCR mit telomerspezifischen Primern durchgeführt [131]. Um eine optimale Durchführung der qRT-PCR zu gewährleisten, wurde eine 6-Punkt-Standardkurve aus einer Gruppe von 10 gepoolten Kontroll-DNAs erstellt ( $R^2 > 0,99$ ). Die Messung erfolgte für jede Probe als Doppelbestimmung, zudem diente ein Ansatz ohne DNA (*no template control*, NTC) als Negativkontrolle. Als Referenzgen wurde das *single-copy*-Gen 36b4 benutzt, welches im gesamten Genom nur in einer einzigen Kopie vorliegt. Pro Probe wurden zu 3  $\mu\text{l}$  (40 ng/3  $\mu\text{l}$ ) DNA 22  $\mu\text{l}$  Mastermix (*Tabelle 13*) hinzupipettiert.

Telo2-Komponente	Volumen pro Probe für	Volumen pro Probe für 36b4
<b>SYBR® Green</b>	7,50 $\mu\text{l}$	7,57 $\mu\text{l}$
<b>fwd-Primer</b>	0,038 $\mu\text{l}$ (150 nM)	0,025 $\mu\text{l}$ (100 nM)
<b>rev-Primer</b>	0,038 $\mu\text{l}$ (150 nM)	0,025 $\mu\text{l}$ (100 nM)
<b>PCR-H<sub>2</sub>O</b>	14,42 $\mu\text{l}$	14,43 $\mu\text{l}$

*Tabelle 13: Zusammensetzung des Mastermix für qRT-PCR-Analysen zur Telomerlängenmessung.*

*Komponente, Volumen pro Probe für Telo2, Volumen pro Probe für 36b4.*

Nach Auftragen in eine Mikrotiterplatte wurden die Proben kurz runterzentrifugiert und in die Vorrichtung des *7900 HT Sequence Detector* eingesetzt. In dem Thermocycler fanden die in der nachfolgenden *Tabelle 14* aufgelisteten Reaktionsschritte statt.

Reaktionsschritt	Temperatur	Inkubationszeit	
<b>Denaturierung</b>	95°C	3 min	
<b>Denaturierung</b>	95°C	15 s	} 40x
<b>Annealing/Extension</b>	58°C	1 min	

*Tabelle 14: Etabliertes PCR-Programm zur Amplifikation der Telo2- und 36b4-codierenden Sequenzen.*

*Reaktionsschritt, Temperatur, Inkubationszeit und Anzahl an PCR-Zyklen.*

Um sicherzustellen, dass die zu untersuchende Sequenz spezifisch amplifiziert wurde, wurde im Anschluss eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die DNA wurde dazu von 40 bis 60°C in 1°C-Schritten langsam erhitzt; erst beim Schmelzpunkt des DNA-Fragments wurde der Farbstoff freigegeben und somit die Fluoreszenzintensität erhöht. Da sich die DNA der generierten Amplifikate durch einen höheren Schmelzpunkt, verglichen mit unspezifischen PCR-Produkten, auszeichnet, sollte die Schmelzkurve einen einzelnen Peak aufweisen.

### 3.2.6.3.2. Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR

Zur Messung der Genexpression wurde die synthetisierte cDNA (Kap.3.2.5.4.) eingesetzt. Zunächst wurden die Primer 1:20 mit Aqua ad iniectabilia vorverdünnt. Zu 17 µl Mastermix (*Tabelle 15*) wurden 3 µl cDNA pro Probe hinzupipettiert. Die ribosomale 18S-(r)RNA diente als interner Standard bzw. „Housekeeping“-Gen für jede Probe.

Komponente	Volumen pro Probe
<b>SYBR® Green</b>	7,0 µl
<b>fwd-Primer</b>	0,5 µl
<b>rev-Primer</b>	0,5 µl
<b>PCR-H<sub>2</sub>O</b>	9,0 µl

*Tabelle 15: Zusammensetzung des Mastermix für qRT-PCR-Analysen zur Genexpressionsanalyse. Komponente, Volumen pro Probe für die jeweilige Target- und die 18S-rRNA.*

Das weitere Vorgehen fand wie oben beschrieben statt.

### 3.2.6.3.3. Auswertung

Die Quantifizierung der Transkriptmenge erfolgte mittels  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. In dem Bereich der exponentiellen Amplifikationsphase wurde eine Schwelle (*threshold*) gelegt, sodass jeder Amplifikationskurve ein PCR-Zykluswert (CT-Wert, *cycle threshold*), bei dem das Fluoreszenzsignal diesen Schwellenwert überschritt, zugeordnet werden konnte. Die Normalisierung der Daten erfolgte anhand der beiden Referenzgene 36b4- (für die Telomerlängen-PCR) und 18S-rRNA (für die Expression der *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA)). Um die n-fache Expression des Targetgens in den Proben in Relation zur Genexpression in der Kontrolle zu kalkulieren, wurde mit Hilfe nachstehender Gleichung die relative Transkription (rT) ermittelt:

$$\Delta CT = CT(\text{Targetgen}) - CT(\text{Referenzgen})$$

$$\Delta\Delta CT = CT(\text{Probe}) - CT(\text{Kontrolle})$$

$$rT = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

## 3.2.7. Analyse der enzymatischen Aktivität der Telomerase

### 3.2.7.1. CHAPS-Isolation aus Gewebe

Zunächst wurden die Gewebestücke in 100  $\mu$ l gekühltem TRAPeZe 1xCHAPS Lysis Buffer aufgenommen und zur Zellfraktionierung mit Hilfe eines Potter-Homogenisators lysiert. Das Isolat wurde für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (4°C; 20 min; 4000 rpm). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und zur Verhinderung einer Inaktivierung der Telomerase durch ubiquitär vorhandene RNAsen mit 2  $\mu$ l RNAsin versetzt.

### 3.2.7.2. CHAPS-Isolation aus MNC

Das für  $1 \times 10^6$  MNC benötigte Volumen wurde aus der Gesamtsuspension (Kap. 3.2.3.1.2.) in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Proben

zentrifugiert (10 min; 3000 rpm) und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Das Zellpellet wurde, wie eben in Kap. 3.2.7.1. beschrieben, weiter prozessiert.

### 3.2.7.3. Photometrische Konzentrationsbestimmung

Um in den Proben die gleiche Gesamtkonzentration zellulärer Proteine zu erhalten, erfolgte die photometrische Konzentrationsbestimmung nach Lowry (Kap. 3.2.4.3.).

### 3.2.7.4. TRAP-Assay

Die enzymatische Aktivität der Telomerase in Gewebe und Zellen wurde mittels TRAP-Assay gemessen [41]. Das Prinzip beruht auf zwei wesentlichen Reaktionsschritten:

- Elongation des TS-Primers (*forward*-Primer) durch die Telomerase in Abhängigkeit ihrer katalytischen Aktivität
- Amplifikation der so generierten Nukleinsäuresequenzen durch PCR mittels ACX-Primer (telomerspezifischer *reverse*-Primer) und DNA-Polymerase

Zunächst wurden jeweils 10 µg der Gewebeproben auf 50 µl mit DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt. Anschließend wurden 5 µl dieser Lösung (1 µg Protein/ 5 µl) mit jeweils 15 µl Mastermix (10,6 µl PCR-H<sub>2</sub>O, 2 µl SYBR Green PCR Master Mix, 0,4 µl MgCl<sub>2</sub> und 2 µl Primermischung (aus 5 µl ACX-Primer, 10 µl TS-Primer und 185 µl DEPC-H<sub>2</sub>O)) in *LightCycler*-Glaskapillaren überführt. Zur Analyse der MNC wurde das Lysat von 10.000 MNC benutzt. Als Positivkontrolle dienten HEK (*Human Embryonic Kidney*) 293-Tumorzellen (n=1000) mit hoher Telomeraseaktivität, als Negativkontrolle TRAPeze 1xCHAPS Lysis Buffer. Die Proben wurden anschließend mit 3000 rpm kurz runterzentrifugiert. Während der nachfolgenden 30-minütigen Inkubation bei 30 °C in einem Umluftinkubator führte die Aktivität der reversen Transkriptase, als katalytische Untereinheit der Telomerase, zur Elongation des TS-Primers. Im Anschluss wurden die Kapillaren in den *LightCycler* überführt. Die nun folgende qRT-PCR lief folgendermaßen ab:

- 10-minütige Denaturierung der DNA und der Telomerase bei 95°C
- 40 Zyklen mit jeweils 20 s bei 95°C zur Denaturierung, 30 s bei 60°C zur ACX-Primerhybridisierung und 50 s bei 72°C zur Elongation
- Erhebung einer Schmelzkurve während 15 s bei 90°C



Im Vorfeld wurde in einem separaten Lauf eine 12-Punkt-Standardkurve einer Verdünnungsreihe von 2 bis 2.000 HEK-Zellen mit annähernd linearem Verhältnis ( $R^2 > 0,99$ ) erzielt (Abbildung 5).

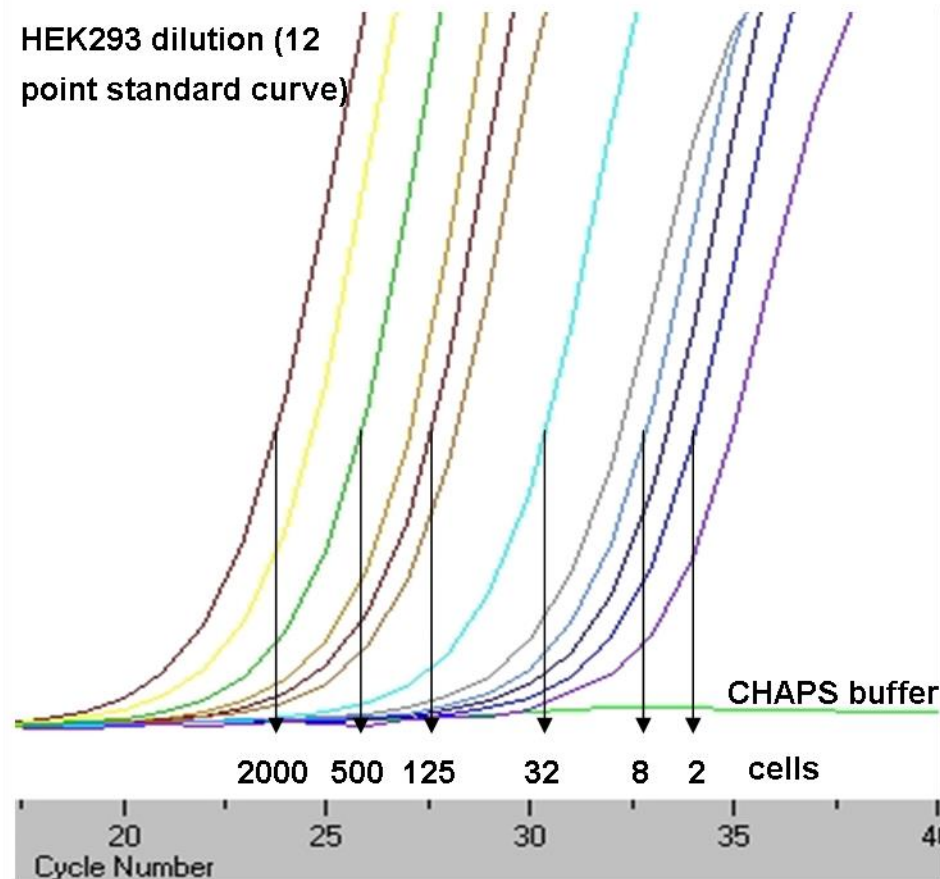


Abbildung 5: exemplarische Darstellung einer 12-Punkt-Standardkurve einer Verdünnungsreihe von 2 – 2.000 HEK-Zellen in einem TRAP-Assay mit CHAPS buffer als negative Kontrolle. CHAPS: Cholamidopropyl-dimethyl-ammoniopropansulfonat HEK: Human Embryonic Kidney; TRAP: Telomere-Repeat Amplification Protocol.

Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wurde der interkalierende Farbstoff SYBR<sup>®</sup> Green verwendet. Wenn die Probe ein über der dreifachen Standardabweichung des Mittelwerts liegendes PCR-Signal im Vergleich zur Negativkontrolle erbrachte, wurde sie als Telomerase-positiv definiert. Zur Berechnung der enzymatischen Aktivität wurde folgende Formel angewandt:

$$\text{Telomeraseaktivität} = (3 * 10^7) * e^{-0,4655 * \text{generierte Anzahl an PCR-Zyklen}}$$

Im Anschluss wurde das Verhältnis des PCR-Signals der Proben zu den HEK293-Zellen bestimmt und entsprechend der mit der Standardkurve generierten Exponentialfunktion als HEK-Zell-Äquivalent angegeben.

### 3.2.8. Histologische Analysen

Zur morphometrischen Analyse des Herzgewebes der WT- und TERT-Mauslinien sowie zur Prüfung einer Korrelation zwischen den molekularbiologischen Befunden und organischen Veränderungen wurden die nachfolgenden histologischen Methoden durchgeführt.

#### 3.2.8.1. Paraffineinbettung und Anfertigung von Schnitten

Die in 4%iger Formaldehydlösung fixierten Gewebe wurden in Einbettkassetten überführt und über Nacht unter fließendem Wasser gespült. Danach wurden die Gewebe durch eine aufsteigende Ethanolreihe entwässert und in Paraffin eingebettet (*Tabelle 16*). Die beschriebenen Reaktionsschritte wurden über Nacht in einem Gewebeeinbettautomat (*Shandon Excelsior™*, Thermo Fisher, Langenselbold, DE) automatisch durchgeführt.

Inkubationsmedium	Inkubationszeit
<b>50% Ethanol</b>	65 min
<b>70% Ethanol</b>	65 min
<b>80% Ethanol</b>	110 min
<b>100% Ethanol</b>	110 min; 2 x 130 min
<b>Xylol</b>	2 x 55 min; 120 min
<b>Paraffinbäder (56°C)</b>	60 min; 2 x 120 min

*Tabelle 16: automatisches Programm zur Paraffineinbettung im Gewebeeinbettautomat.  
Inkubationsmedium, Inkubationszeit.*

Im Anschluss wurden die Gewebe in Metallförmchen gelegt, mit flüssigem 56°C warmem Paraffin übergossen und mit dem Unterteil der Einbettkassette zusammen ausgeblockt. Mit einem Rotationsmikrotom wurden anschließend 3 µm dünne Schnitte

trocken angefertigt, diese in ein Wasserbad überführt und auf Polysin-beschichtete Objektträger übertragen. Bis zum Folgetag wurden die Schnitte bei 60°C getrocknet und danach in einer Kassette bei Raumtemperatur aufbewahrt.

### 3.2.8.2. Sirius Red-Färbung

Um den Fibrosegrad des Myokards zu quantifizieren, wurde die Sirius Red-Färbung durchgeführt. Bei Sirius Red handelt es sich um einen Farbstoff, welcher aufgrund seiner Sulfonsäuregruppen die im Bindegewebe enthaltenen basischen Gruppen anfärbt. Große Kollagenfibrillen werden orange-rot, kleine Fibrillen hingegen grünlich angefärbt. Da das Zytoplasma der Kardiomyozyten gelb erscheint, konnte aufgrund der Farbunterscheidung der linksventrikuläre Kollagengehalt bestimmt werden. Nach Ablauf des Färbeprotokolls (*Tabelle 17*) wurden die Schnitte mit Entellan® eingedeckt.

Inkubationsmedium	Inkubationszeit
<b>Xylol</b>	3 x 3 min
<b>absteigend 100%, 90%, 70% Isopropanol</b>	je 3 min
<b>Aqua dest.</b>	1 min
<b>0,1% Sirius Red-Lösung</b>	60 min
<b>0,01 M HCl</b>	2 min
<b>aufsteigend 90%, 100% Isopropanol</b>	je 2 min
<b>Xylol</b>	3 x 3 min

*Tabelle 17: Färbeprotokoll zur Sirius Red-Färbung von Paraffinschnitten  
Inkubationsmedium, Inkubationszeit*

In 10-facher Vergrößerung wurden ca. 12 Gesichtsfelder aufgenommen und die Gesamtgewebefläche sowie die kollagenhaltige Gewebefläche mit Hilfe der Software *NIS-Elements* bestimmt. Der prozentuale Kollagenanteil der ventrikulären Fläche wurde unter Verwendung der nachstehenden Gleichung berechnet.

$$\text{Fibrosegrad [\%]} = \frac{\text{kollagenhaltige Gewebefläche}}{\text{Gesamtgewebefläche}} * 100$$

### **3.2.9. Statistische Auswertung der Ergebnisse**

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurden die Programme *Microsoft Excel 2010*, *GraphPad Prism Version 5.01* und *IBM SPSS Statistics Version 20* verwendet. Die experimentellen Daten der vorliegenden Arbeit wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Für die Gruppenvergleiche bei normal verteilten Parametern dienten der ungepaarte T-Test (für zwei Gruppen) und die einfaktorielle ANOVA (für mehr als zwei Gruppen). Eine statistische Signifikanz wurde für p-Werte  $< 0,05$  angenommen.

## 4. Ergebnisse

### 4.2. Studiendesign

In C57Bl/6N-WT-Mäusen (männlich, 10-14 Wochen alt, n=6-10 pro Gruppe) wurde durch permanente Ligatur der proximalen LAD ein MI verursacht. Die Kontrolltiere erhielten die gleiche Operation, jedoch ohne eine Ligatur der LAD zu vollziehen („Sham-OP“). Um mögliche zeitliche Unterschiede in der Regulation zu detektieren, wurden die initialen Laborexperimente 3, 7 und 28 Tage nach Operation durchgeführt (*Abbildung 6*). Zunächst wurde das Myokard molekularbiologisch analysiert, welches zur Messung regionaler Unterschiede bei den MI-Tieren in IZ und RZ und bei den Sham-Tieren in VW und RZ unterteilt wurde. Des Weiteren wurden das Leberparenchym, die Aorta ascendens und MNC aus der Milz zur Messung von Effekten auf extrakardiale Organe bzw. Zellen untersucht. Ferner wurden genetisch veränderte Mäuse ( $TERT^{-/-}$ , weiblich, 11-34 Wochen alt, n=6 mit Scheineingriff und n=9 mit MI) und zusätzliche WT-Kontrollen ( $TERT^{+/+}$ , weiblich, 11-34 Wochen alt, ebenfalls n=6 bzw. n=9) erforscht, nachdem in den erstgenannten Untersuchungen interessante Ergebnisse insbesondere 28 Tage nach LAD-Ligatur festzustellen waren. Dementsprechend wurden die Knockoutmäuse und WT-Kontrollen ebenfalls zu diesem Zeitpunkt nach Operation untersucht. Bei diesen Tieren erfolgten noch kurz vor Organentnahme eine Kardio-MRT und eine invasive linksventrikuläre Druckmessung. In einem letzten Schritt wurden histologische Analysen des Herzmuskels durchgeführt.

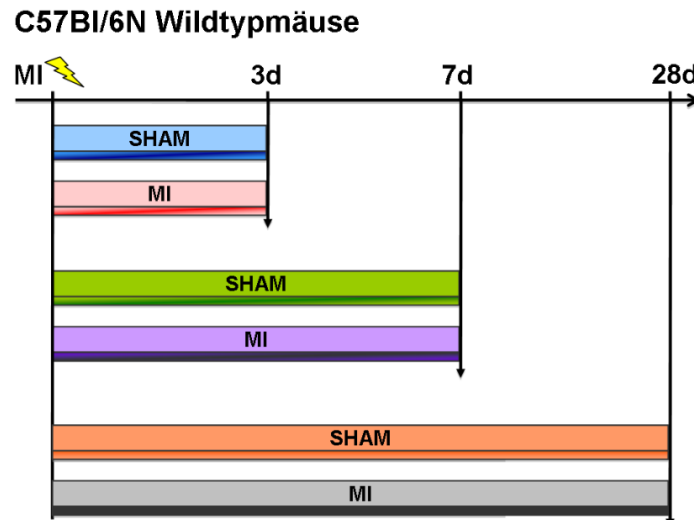


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Studiendesigns der initialen Gruppe zur Untersuchung einer möglichen zeitlichen Dynamik von Regulationsmechanismen 3, 7 und 28 Tage nach MI in WT-Mäusen. MI: Myokardinfarkt; WT: Wildtyp

### 4.3. Funktionelle und morphologische Analyse des Herzens mittels MRT

Die Untersuchung der myokardialen Funktion und Struktur erfolgte mittels Kardio-MRT am Tag vor der Organentnahme, d.h. 27 Tage nach der proximalen LAD-Ligatur. Die nach Teichholz abgeleitete Berechnung der LV-EF aus MRT-Parametern, diagonal in Kurzachsenblicken in Enddiastole und Endsystole gemessen, ergab eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Reduktion in  $TERT^{+/-}$  und  $TERT^{-/-}$ -Mäusen (Tabelle 18). Die softwaregestützte Berechnung zeigte ebenfalls eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Reduktion der LV-EF nach MI in beiden Genotypen (Tabelle 19). Weiterhin war der KI in beiden Gruppen erniedrigt ( $p < 0,05$ ). Die Quantifizierung der enddiastolischen LVM ergab lediglich in den Infarktmäusen mit TERT-Defizienz eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Veränderung (Tabelle 19). Sämtliche Infarktmäuse wiesen visuell hypo-, a- oder dyskinetische Myokardsegmente im LAD-Stromgebiet auf. In den Sham-Mäusen hingegen waren keine regionalen Wandbewegungsstörungen zu finden. Die visuelle Analyse ergab, dass die bewegungsgestörten Segmente von einer Ausdünnung des Myokards betroffen waren. In *Abbildung 7* werden beispielhaft solche infarzierten Areale mit normalem Myokard von Kontrolltieren gegenübergestellt. Mögliche Komplikationen wie Ventrikulaneurysmata oder -rupturen, Hinweise auf relevante

Mitralklappeninsuffizienzen durch Papillarmuskelfarkte oder intrakavitäre Thrombenbildung angrenzend an Infarktareale waren nicht zu detektieren.

Auswertung nach Teichholz	TERT <sup>+/+</sup>		TERT <sup>-/-</sup>	
	Sham	MI	Sham	MI
<b>LV-SV [µl]</b>	40,6 ± 3,3	32,0 ± 7,6 *	40,6 ± 0,6	22,5 ± 2,3 **
<b>LV-EF [%]</b>	81,4 ± 0,5	62,0 ± 7,9 *	73,0 ± 2,3 *	53,5 ± 6,0 **
<b>LV-EDD [mm]</b>	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,2	3,6 ± 0,0	3,3 ± 0,1 #
<b>LV-EDV [µl]</b>	49,9 ± 4,2	50,4 ± 8,2	55,7 ± 1,2	42,7 ± 3,3 #

Tabelle 18: Teichholzauswertung des Kardio-MRT 27 Tage nach MI in TERT<sup>+/+</sup>- und TERT<sup>-/-</sup>-Mäusen (Mittelwert ± SEM). \*p<0,05 vs. Sham<sup>+/+</sup> (T-Test); #p<0,05 vs. Sham<sup>-/-</sup> (T-Test). EDD: enddiastolischer Durchmesser; EDV: enddiastolisches Volumen; EF: Ejektionsfraktion; LV: linker Ventrikel; MI: Myokardinfarkt; MRT: Magnetresonanztomografie; SV: Schlagvolumen; TERT: Telomerase-Reverse-Transkriptase

Konturauswertung	TERT <sup>+/+</sup>		TERT <sup>-/-</sup>	
	Sham	MI	Sham	MI
<b>LV-EF [%]</b>	47,1 ± 3,9	35,5 ± 2,5 *	61,7 ± 5,8 *	46,8 ± 6,1 #
<b>KI [µl/s/g]</b>	8,5 ± 0,9	6,0 ± 0,4 *	12,5 ± 2,8 *	10,9 ± 1,1 #
<b>LV-EDV [µl]</b>	59,4 ± 3,3	58,8 ± 1,4	60,4 ± 1,6	47,0 ± 0,6 **
<b>LV-M [mg]</b>	68,6 ± 1,3	58,7 ± 10,8	68,9 ± 0,9	62,1 ± 2,7 #

Tabelle 19: Konturauswertung des Kardio-MRT 27 Tage nach MI in TERT<sup>+/+</sup>- und TERT<sup>-/-</sup>-Mäusen (Mittelwert ± SEM). \*p<0,05 vs. Sham<sup>+/+</sup> (T-Test); #p<0,05 vs. Sham<sup>-/-</sup> (T-Test). KI: kardialer Index; EDV: enddiastolisches Volumen; EF: Ejektionsfraktion; LV: linker Ventrikel; M: Masse; MI: Myokardinfarkt; MRT: Magnetresonanztomografie; TERT: Telomerase-Reverse-Transkriptase.

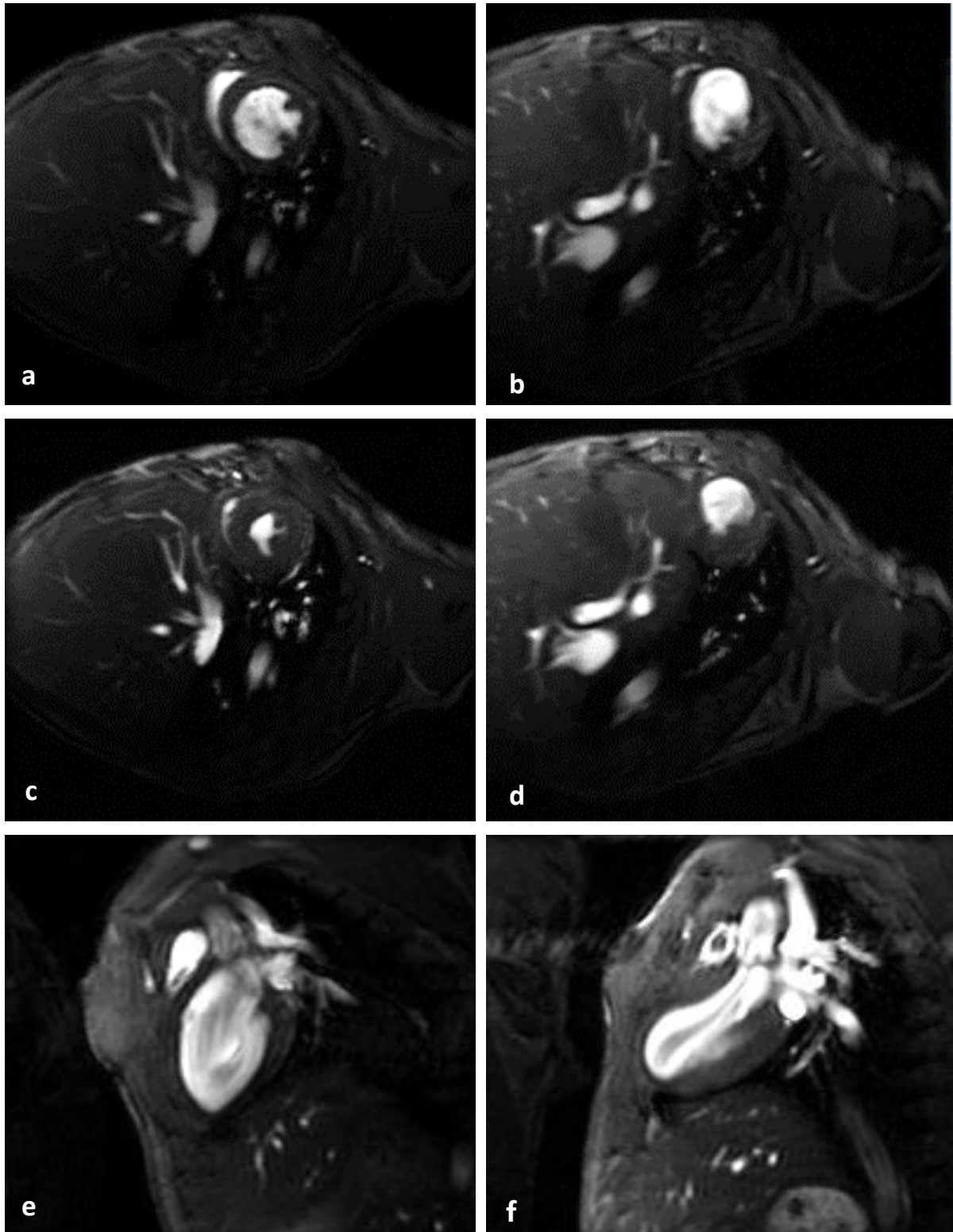


Abbildung 7: Mittventrikuläre Kurzachsenblicke in Enddiastole (a, b) und Endsystole (c, d) sowie Längsachsenblicke (e, f) in Enddiastole, dargestellt mittels bSSFP-Sequenz im Cardio-MRT. Strukturell unauffällige Darstellung des Myokards in einem Kontrolltier ohne Infarkt (a, c, e). In der Infarktmaus findet sich hingegen mittventrikulär anterior-anteroseptal (b, d) und mittventrikulär-apikal anteroseptal (f) eine hochgradige Myokardausdünnung des Myokards, vereinbar mit einem Transmuralinfarkt im LAD-Stromgebiet. Im Cine-Modus weisen die infarzierten Segmente eine Akinesie mit global leicht reduzierter systolischer Funktion auf. bSSFP: balanced steady-state free precession; LAD: left anterior descending; MRT: Magnetresonanztomographie.



#### 4.4. Intrakardiale Druckmessung

Eine detaillierte Auflistung der Ergebnisse findet sich in der *Tabelle 20*. Ähnlich zur Kardio-MRT fand sich in den Infarktmäusen eine Tendenz zu höheren Herzfrequenzen. Insgesamt zeigten sich beim statistischen Vergleich der MI-Tiere beider Genotypen keine signifikanten Unterschiede in den entscheidenden Parametern der Hämodynamik. Tendenziell war durch den Myokardinfarkt klar eine myokardiale Dysfunktion induziert worden, aber für ein klares statistisches Ergebnis hätten mehr Tiere untersucht werden müssen. Für das Experiment wurde nur eine Gruppe untersucht (n=3 Sham bzw. n=4 MI), weil durch die linksventrikuläre Punktion und die Druckmessung das Gewebe nicht mehr optimal für die weiteren Assays einsetzbar ist und wir bzgl. der Verfügbarkeit der TERT-Stämme von der Düsseldorfer Arbeitsgruppe wie o.g. abhängig waren.

Parameter	TERT <sup>+/+</sup>		TERT <sup>-/-</sup>	
	Sham	MI	Sham	MI
<b>HF [min<sup>-1</sup>]</b>	200 ± 27	252 ± 41	158 ± 3	207 ± 24
<b>LV max. Druck [mmHg]</b>	99,3 ± 7,9	70,4 ± 24,3	92 ± 2,9	76,9 ± 8,6
<b>LV mittl. Druck [mmHg]</b>	46,2 ± 5,8	32,1 ± 8,6	38,1 ± 2,9	31,7 ± 6,4
<b>LV min. Druck [mmHg]</b>	19,7 ± 4,9	12,8 ± 1,0	11,1 ± 3,0	11,9 ± 4,8
<b>LVEDP [mmHg]</b>	28,5 ± 1,2	31,9 ± 0,8	30,1 ± 3,4	35,8 ± 2,2
<b>dP/dtmax [mmHg/s]</b>	2780 ± 139	2077 ± 756	2618 ± 45	2302 ± 375
<b>dP/dtmin [mmHg/s]</b>	2533 ± 197	1962 ± 789	2422 ± 3	2072 ± 447

*Tabelle 20: Darstellung der Messergebnisse der invasiven intrakardialen Druckmessung mittels Millar-Katheter 4 Wochen nach MI in TERT<sup>+/+</sup>- und TERT<sup>-/-</sup>-Mäusen (Mittelwert ± SEM, n=3-4). dP/dtmax; maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit; dP/dtmin: maximale Druckabfallsgeschwindigkeit; HF: Herzfrequenz; LVEDP; linksventrikulärer enddiastolischer Druck; MI: Myokardinfarkt; TERT: Telomerase-Reverse-Transkriptase.*

#### 4.5. Bestimmung von Gewichtsindices

Umgehend nach schmerzloser Tötung der Versuchstiere erfolgten die Messungen der Tibiallänge, des KG und des Feuchtgewichts des Herzens, der Leber und der Lunge. Sämtliche Mittelwerte ± SEM sind in *Tabelle 21* aufgelistet. Anhand der Messungen

der Parameter Herz-/KG und Herzgewicht/Tibiallänge gab es bei beiden Genotypen keinen eindeutigen Anhalt für eine myokardiale Hypertrophie ( $p > 0,05$ ). Zudem fanden sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des KG und der übrigen Organgewichtindices.

Parameter	TERT <sup>+/+</sup>		TERT <sup>-/-</sup>	
	Sham	MI	Sham	MI
<b>Körpergewicht [g]</b>	22,6 ± 0,6	22,0 ± 0,5	22,8 ± 0,5	22,6 ± 0,6
<b>Herz-/ Körpergewicht [g/g*100]</b>	0,96 ± 0,05	0,98 ± 0,06	0,93 ± 0,05	0,98 ± 0,04
<b>Herzgewicht/ Tibiallänge [g/mm*100]</b>	1,18 ± 0,08	1,22 ± 0,09	1,24 ± 0,06	1,24 ± 0,04
<b>Lungenfeucht-/ Körpergewicht [g/g*100]</b>	0,83 ± 0,04	0,83 ± 0,05	0,79 ± 0,03	0,90 ± 0,04
<b>Leberfeucht-/ Körpergewicht [g/g*100]</b>	4,30 ± 0,17	4,33 ± 0,21	4,44 ± 0,18	3,79 ± 0,12

Tabelle 21: Körpergewicht und Organgewichtsindices 4 Wochen nach MI in TERT<sup>+/+</sup>- und TERT<sup>-/-</sup>-Mäusen (Mittelwert ± SEM). MI: Myokardinfarkt; TERT: Telomerase-Reverse-Transkriptase.

## 4.6. Effekte einer Myokardischämie auf Telomerbiologie, Seneszenzmarker, Apoptosemediatoren und Zellzyklusregulatoren in Wildtypmäusen

### 4.6.1. Kardiale Signaltransduktion

#### 4.6.1.1. Zeit- und gebietsabhängige kardiale Regulation der Telomeraseaktivität, der Telomerlänge und der TRF2-Expression

Bereits 3 Tage nach LAD-Ligatur war die Telomeraseaktivität innerhalb der IZ im Vergleich zur RZ der Kontrolltiere signifikant erhöht ( $187 \pm 9\%$ ;  $p < 0,05$ ). Zwischen den enzymatischen Aktivitäten in der RZ beider Gruppen lagen zu diesem Zeitpunkt keine

signifikanten Unterschiede vor ( $113 \pm 35$ ). 7 Tage nach induziertem MI war die Aktivität der Telomerase dann sowohl in der IZ- ( $154 \pm 26\%$ ,  $p < 0.05$ ) als auch in der RZ gesteigert ( $177 \pm 31\%$ ;  $p < 0.05$ ). Dieser Effekt war an Tag 28 in der IZ noch stärker ausgeprägt ( $304 \pm 28\%$ ;  $p < 0.05$ ) bei gleichbleibend hoher Aktivität in der RZ ( $177 \pm 18\%$ ;  $p < 0.05$ ) (Abbildung 8). 4 Wochen nach Infarktbildung zeigten PCR-Analysen eine signifikante Verlängerung der Telomere in der IZ ( $185 \pm 29\%$ ;  $p < 0.05$ ) und in der RZ ( $282 \pm 23\%$ ;  $p < 0.05$ ) (Abbildung 9). Zur Evaluation der Stabilisierung der Telomere untersuchten wir anschließend die Proteinexpression von TRF2. Parallel zur gesteigerten Aktivität der Telomerase zeigte sich passager eine signifikant erhöhte TRF2-Proteinexpression, und zwar nach 3 Tagen ausschließlich in der IZ ( $337 \pm 26\%$ ;  $p < 0.05$ ; RZ:  $120 \pm 32\%$ ) und später an Tag 7 sowohl in der IZ ( $423 \pm 48\%$ ;  $p < 0.05$ ) als auch in der RZ ( $380 \pm 31\%$ ;  $p < 0.05$ ). An Tag 28 war die TRF2-Expression in beiden Zonen wieder auf Kontrollniveau (IZ:  $115 \pm 38\%$ ; RZ:  $93 \pm 25\%$ ) (Abbildung 10).

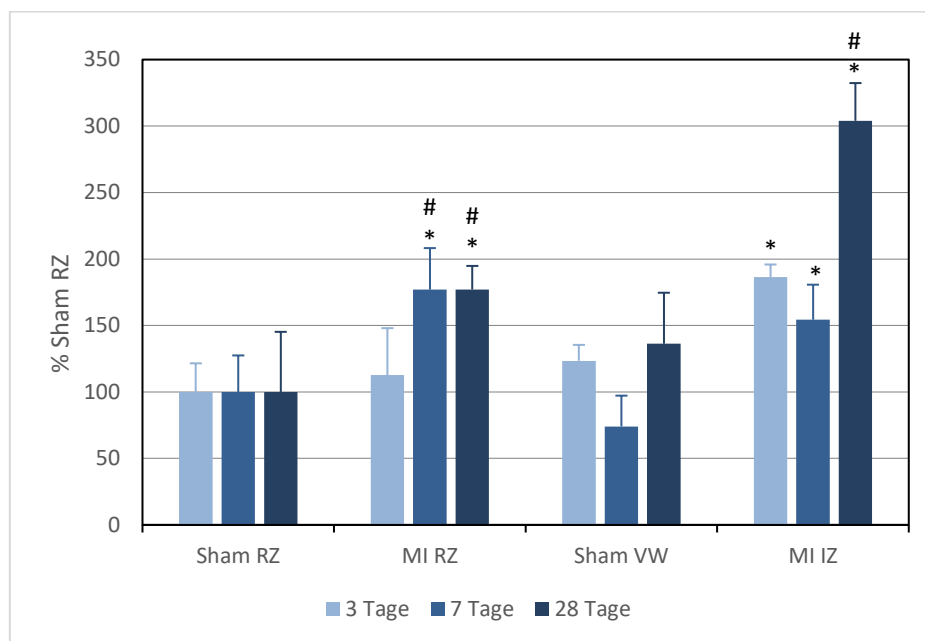


Abbildung 8: Darstellung der myokardialen Telomeraseaktivität im zeitlichen Verlauf 3, 7 und 28 Tage nach MI in WT-Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham RZ (T-Test); # $p < 0,05$  vs. Tag 3 (selbe Region)(ANOVA der 3 Zeitpunkte innerhalb der Region). IZ: Infarktzone; MI: Myokardinfarkt; RZ: Randzone; VW: Vorderwand; WT: Wildtyp.

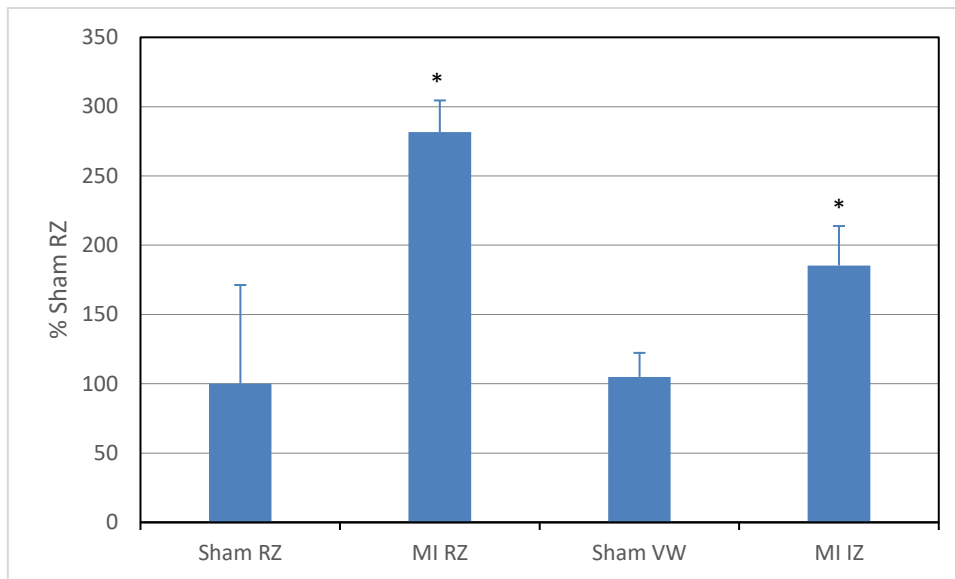


Abbildung 9: Darstellung der myokardialen Telomerlänge 4 Wochen nach MI in WT-Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham RZ (ANOVA). IZ: Infarktzone; MI: Myokardinfarkt; RZ: Randzone; VW: Vorderwand; WT: Wildtyp.

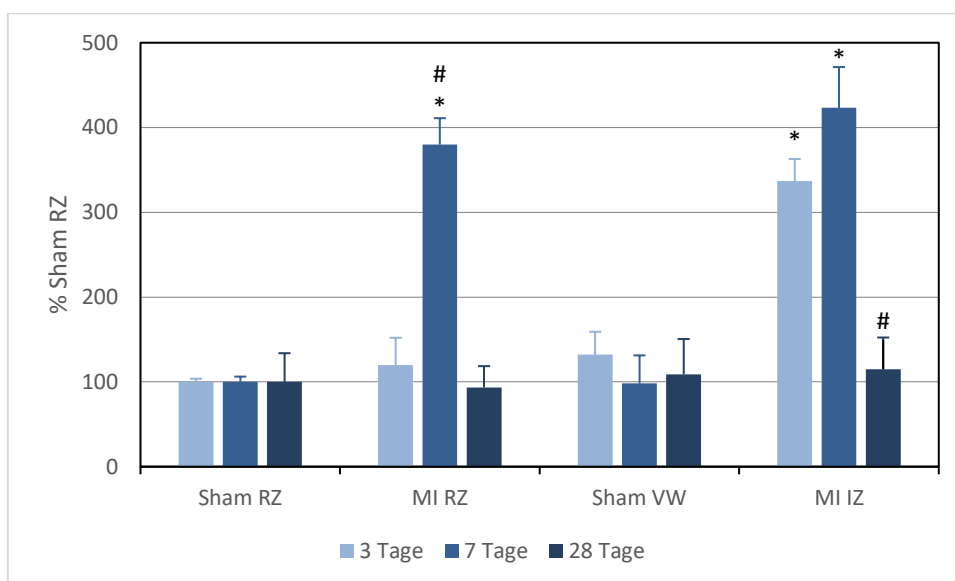


Abbildung 10: Darstellung der myokardialen TRF2-Proteinexpression im zeitlichen Verlauf 3, 7 und 28 Tage nach MI in WT-Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham RZ (T-Test); # $p < 0,05$  vs. Tag 3 (selbe Region) (ANOVA der 3 Zeitpunkte innerhalb der Region). IZ: Infarktzone; MI: Myokardinfarkt; RZ: Randzone; VW: Vorderwand; WT: Wildtyp.

#### 4.6.1.2. Zeit- und gebietsabhängige kardiale Regulation von Seneszenzmarkern, Apoptosemediatoren und Zellzyklusregulatoren

Die zeitlich und regional dynamische Aktivierung der Seneszenzmarker, Apoptosemediatoren und Zellzyklusregulatoren sind graphisch in den *Abbildungen 11-19* dargestellt.

An Tag 3 waren die Proteinexpression der Apoptoseinduktoren und Zellzyklusinhibitoren p53 ( $395\pm 36\%$ ;  $p < 0,05$ ) und Chk2 ( $259\pm 27\%$ ;  $p < 0,05$ ) in der IZ signifikant gesteigert. In diesem Areal wies das pro-apoptotische Protein Bax hingegen nur eine tendenziell geringe Hochregulation ohne Signifikanz auf ( $117\pm 36\%$ ). Diese drei Marker waren zu diesem Zeitpunkt in der RZ allesamt nicht signifikant hochreguliert (p53:  $72\pm 30\%$ ; Chk2:  $72\pm 19\%$ ; Bax:  $103\pm 26\%$ ). Der Apoptoseinhibitor pAKT zeigte hingegen eine zweifach gesteigerte Proteinexpression in der RZ ( $201\pm 31\%$ ;  $p < 0,05$ ) mit simultan mehr als dreifacher Steigerung in der IZ ( $331\pm 22\%$ ;  $p < 0,05$ ). Der Seneszenzmarker p16 (IZ:  $119\pm 54\%$ , RZ:  $94\pm 39\%$ ) war 3 Tage nach MI in beiden Zonen nicht signifikant reguliert.

An Tag 7 zeigte sich eine deutliche Steigerung der Proteinexpression von p53 (IZ:  $363\pm 39\%$ ;  $p < 0,05$ ; RZ:  $388\pm 27\%$ ;  $p < 0,05$ ), Chk2 (IZ:  $888\pm 46\%$ ;  $p < 0,05$ ; RZ:  $669\pm 47\%$ ;  $p < 0,05$ ) und Bax (IZ:  $1144\pm 47\%$ ;  $p < 0,05$ ; RZ:  $216\pm 29\%$ ;  $p < 0,05$ ) in beiden Zonen. Das Protein pAKT wies keine signifikant vermehrte Expression in der IZ mehr auf ( $113\pm 42\%$ ) bei nunmehr auch geringerer Hochregulation in der RZ ( $156\pm 11\%$ ;  $p < 0,05$ ) als zuvor. P16 war mittlerweile nun in der IZ deutlich hochreguliert (IZ:  $345\pm 18\%$ ,  $p < 0,05$ ; RZ:  $86\pm 21\%$ ).

An Tag 28 fiel die Proteinexpression von p53, in der IZ ( $136\pm 39\%$ ;  $p < 0,05$ ) deutlicher als in der RZ ( $189\pm 11\%$ ;  $p < 0,05$ ), ab. Chk2 hingegen war in der IZ signifikant herunterreguliert (IZ  $52\pm 20\%$ ;  $p < 0,05$ ; RZ:  $138\pm 17\%$ ). Die Expression von Bax war in beiden Zonen weiterhin erhöht, wobei in der IZ nun deutlich geringere Werte als an Tag 7 zu verzeichnen waren (IZ:  $232\pm 26\%$ ;  $p < 0,05$ ; RZ:  $218\pm 20\%$ ;  $p < 0,05$ ). PAKT war auch zu diesem Zeitpunkt weiterhin nicht signifikant reguliert (IZ:  $120\pm 11\%$ ; RZ:  $108\pm 21\%$ ). Die Proteinsynthese von p16 war nunmehr in beiden Zonen nur tendenziell und nicht signifikant hochreguliert (IZ:  $200\pm 44\%$ ; RZ  $160\pm 21\%$ ). Dabei zeigte sich parallel eine Überexpression der p16-mRNA (IZ  $452\pm 9\%$ ;  $p < 0,05$ ; RZ  $503\pm 14\%$ ;  $p < 0,05$ ). Ferner war die Proteinexpression (IZ:  $151\pm 19\%$ ;  $p < 0,05$ ; RZ:  $163\pm 14\%$ ;  $p < 0,05$ ) von SIRT1, einem Inhibitor der zellulären Seneszenz, hochreguliert. Der Seneszenzmarker GLB1 hingegen zeigte keine signifikante Hochregulation der Protein- (IZ:  $61\pm 37\%$ , RZ:  $68\pm 42\%$ ) und Genexpression (MI:  $139\pm 12\%$ ). Hierzu ist zu sagen, dass die Aktivität der Seneszenz-assoziierten Beta-Galaktosidase (SA-b-Gal-Färbung) klassischerweise an ganz frischem Gewebe gefärbt wird, was an gefrorenem Gewebe nicht möglich ist. Ob die reine Expression dieses Enzyms (abgeleitet von seinem Gen GLB1) etwas aussagt, ist nicht etabliert.

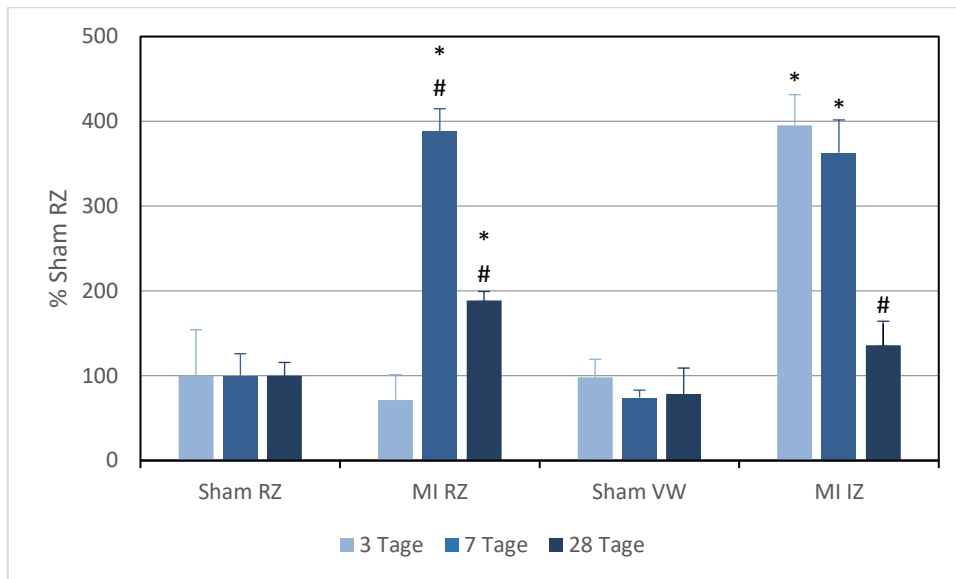


Abbildung 11: Darstellung der myokardialen p53-Proteinexpression im zeitlichen Verlauf 3, 7 und 28 Tage nach MI in WT-Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham RZ (T-Test); # $p < 0,05$  vs. Tag 3 (selbe Region) (ANOVA der 3 Zeitpunkte innerhalb der Region). MI: Myokardinfarkt; RZ: Randzone; VW: Vorderwand; WT: Wildtyp.

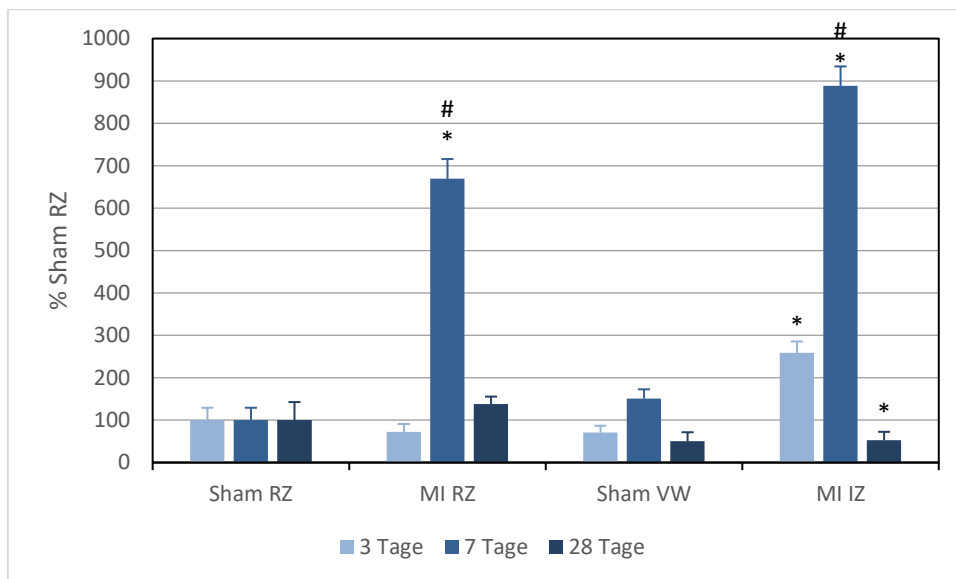


Abbildung 12: Darstellung der myokardialen Chk2-Proteinexpression im zeitlichen Verlauf 3, 7 und 28 Tage nach MI in WT-Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham RZ (T-Test); # $p < 0,05$  vs. Tag 3 (selbe Region) (ANOVA der 3 Zeitpunkte innerhalb der Region). MI: Myokardinfarkt; RZ: Randzone; VW: Vorderwand; WT: Wildtyp.

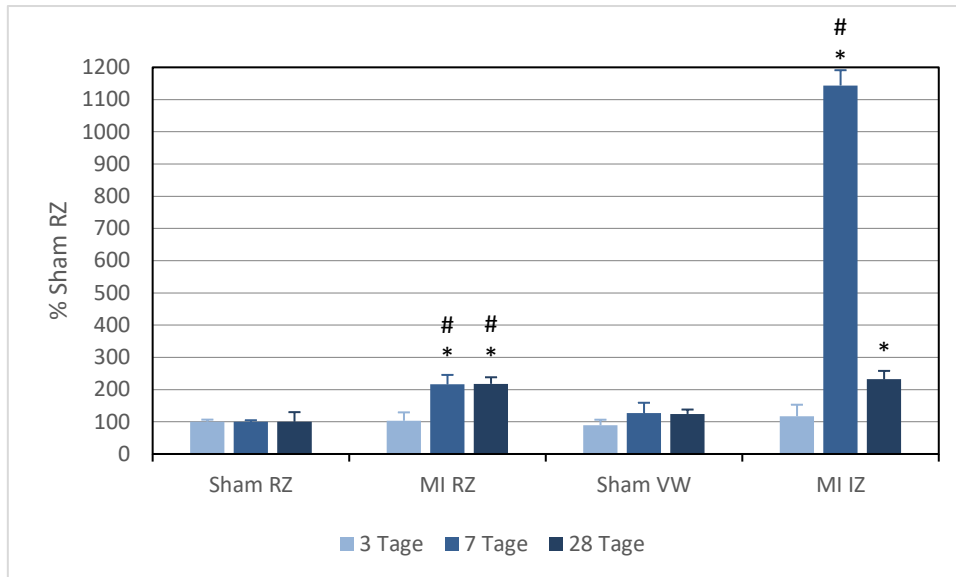


Abbildung 13. Darstellung der myokardialen Bax-Proteinexpression im zeitlichen Verlauf 3, 7 und 28 Tage nach MI in WT-Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham RZ (T-Test); # $p < 0,05$  vs. Tag 3 (selbe Region) (ANOVA der 3 Zeitpunkte innerhalb der Region). MI: Myokardinfarkt; RZ: Randzone; VW: Vorderwand; WT: Wildtyp.

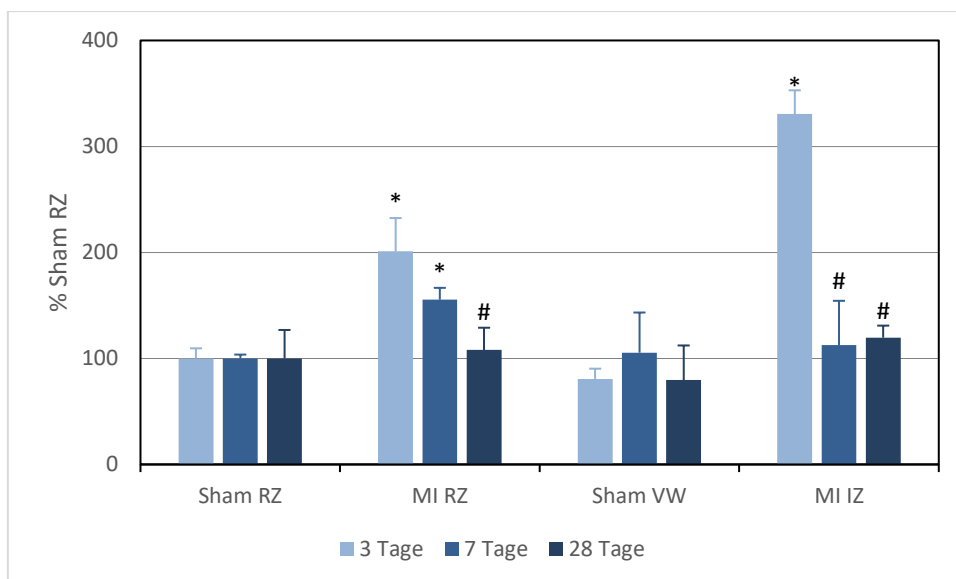


Abbildung 14. Darstellung der myokardialen pAkt-Proteinexpression im zeitlichen Verlauf 3, 7 und 28 Tage nach MI in WT-Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham RZ (T-Test); # $p < 0,05$  vs. Tag 3 (selbe Region) (ANOVA der 3 Zeitpunkte innerhalb der Region). MI: Myokardinfarkt; RZ: Randzone; VW: Vorderwand; WT: Wildtyp.

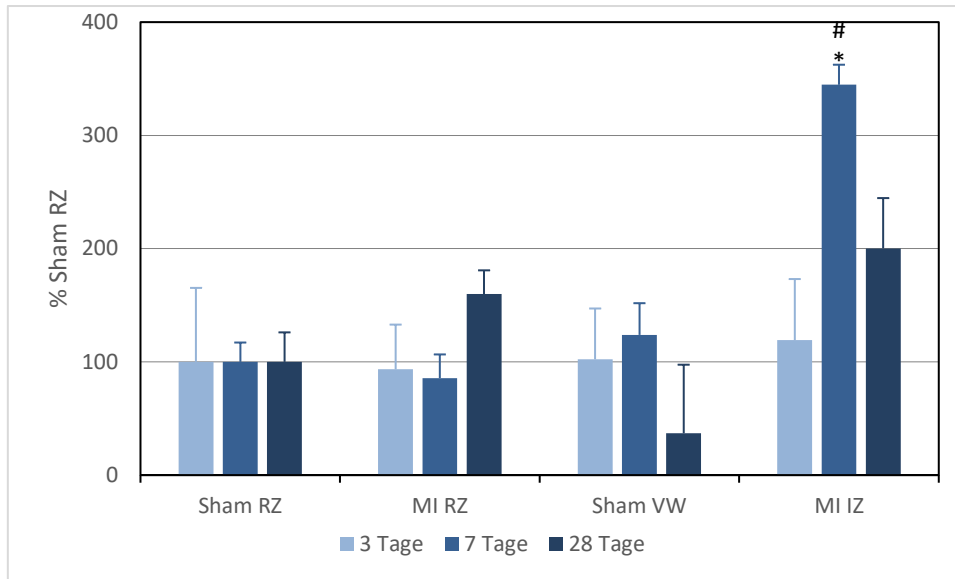


Abbildung 15: Darstellung der myokardialen p16-Proteinexpression im zeitlichen Verlauf 3, 7 und 28 Tage nach MI in WT-Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham RZ (T-Test); # $p < 0,05$  vs. Tag 3 (selbe Region) (ANOVA der 3 Zeitpunkte innerhalb der Region). MI: Myokardinfarkt; RZ: Randzone; VW: Vorderwand; WT: Wildtyp.

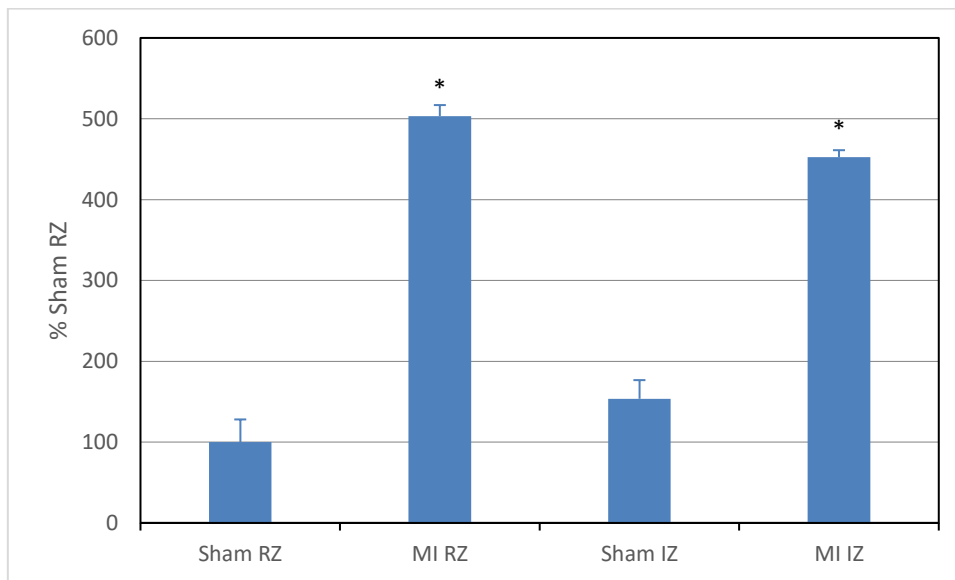


Abbildung 16: Darstellung der myokardialen p16-Genexpression 4 Wochen nach MI in WT-Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham RZ (ANOVA). MI: Myokardinfarkt; RZ: Randzone; WT: Wildtyp.



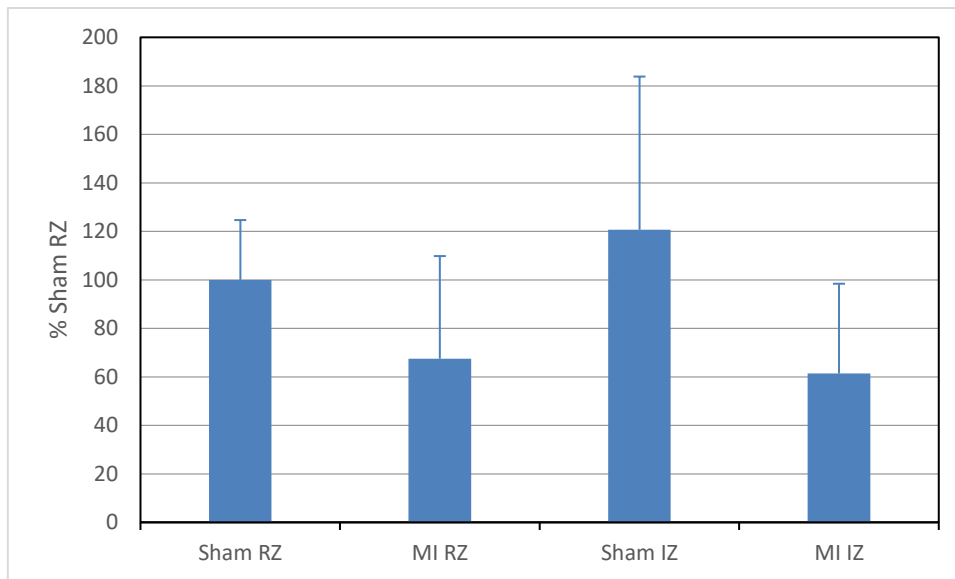


Abbildung 17: Darstellung der myokardialen GLB1-Proteinexpression 4 Wochen nach MI in WT-Mäusen. MI: Myokardinfarkt; RZ: Randzone;; WT: Wildtyp

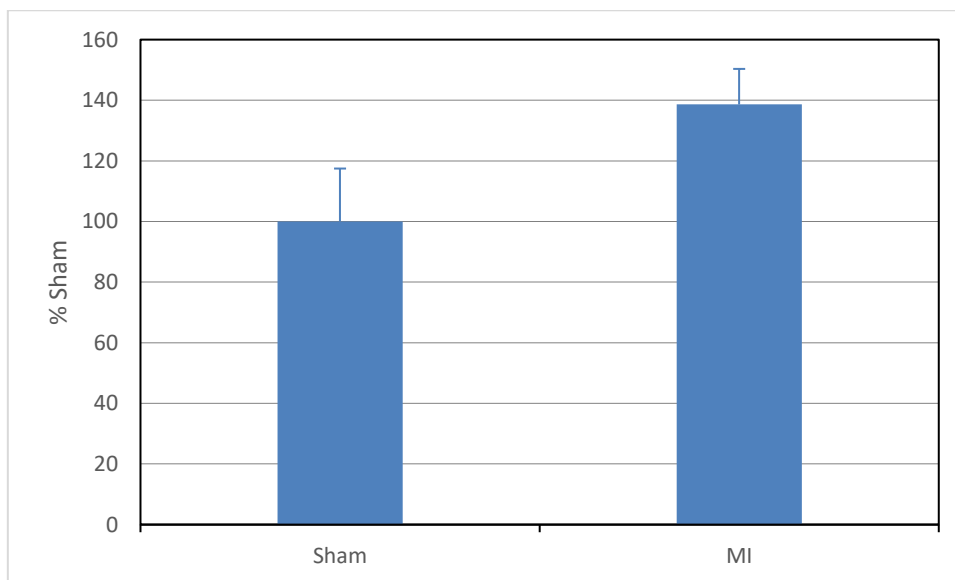


Abbildung 18: Darstellung der myokardialen GLB1-Genexpression 4 Wochen nach MI in WT-Mäusen. MI: Myokardinfarkt; WT: Wildtyp.

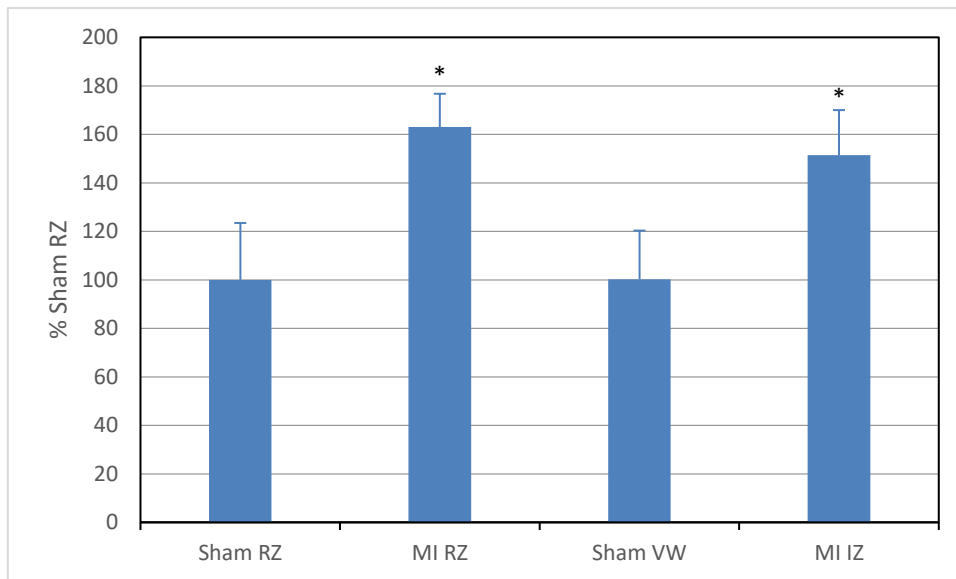


Abbildung 19: Darstellung der myokardialen SIRT1-Proteinexpression 4 Wochen nach MI in WT-Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham RZ (ANOVA). MI: Myokardinfarkt; RZ: Randzone; WT: Wildtyp.

#### 4.6.2. Extrakardiale Signaltransduktion

4.6.2.1. Extrakardiale Regulation der Telomeraseaktivität, der Telomerlänge und der TRF2-Expression 28 Tage nach MI

4.6.2.2. Aorta

Die Aktivität der Telomerase innerhalb der Wand der proximalen Aorta war in den Infarkttieren auf  $81 \pm 30\%$  tendenziell leicht gesunken, allerdings ohne Signifikanz. Im Gegensatz dazu waren sowohl die Telomerlänge als auch die TRF2-Proteinexpression leicht gesteigert, jedoch waren diese Ergebnisse wegen der hohen Streuung ebenfalls nicht signifikant (Abbildung 20).

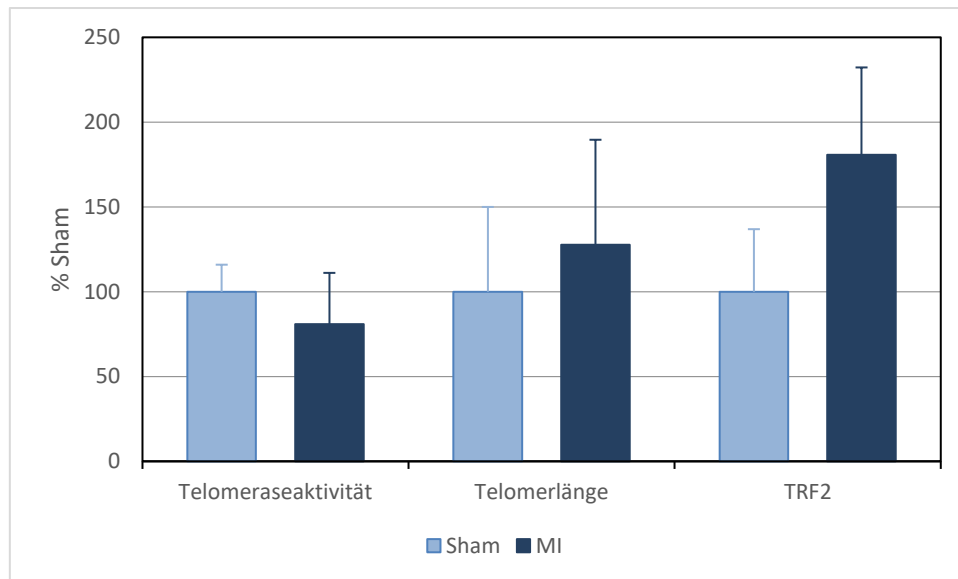


Abbildung 20: Darstellung der aortalen Telomeraseaktivität, Telomerlänge und TRF2-Proteinexpression 4 Wochen nach MI in WT-Mäusen. MI: Myokardinfarkt; WT: Wildtyp.

#### 4.6.2.3. Leber

Die Telomeraseaktivität im Leberparenchym stellte sich 4 Wochen nach Induktion des MI erniedrigt dar ( $38 \pm 40\%$ ;  $p < 0,05$ ). Die Telomerlänge blieb in unseren Untersuchungen konstant auf Kontrollniveau ( $109 \pm 29\%$ ). Gleichzeitig war die Proteinexpression von TRF2 leicht gesteigert ( $148 \pm 38\%$ ), die Genexpression war tendenziell vermindert ( $90 \pm 10\%$ ) (Abbildung 21).

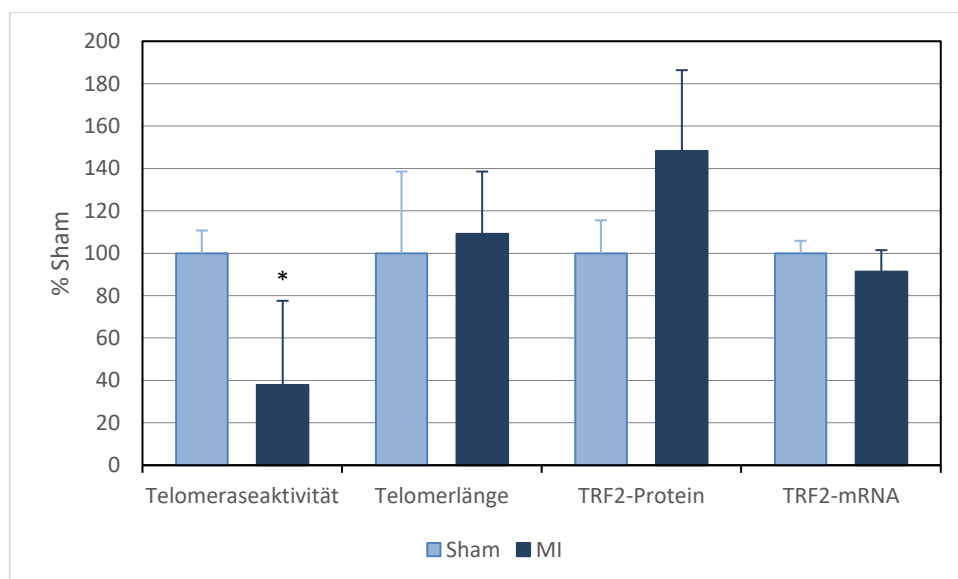


Abbildung 21: Darstellung der hepatischen Telomeraseaktivität, Telomerlänge, TRF2-Proteinexpression und TRF2-Genexpression 4 Wochen nach MI in WT-Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham (T-Test). MI: Myokardinfarkt; WT: Wildtyp.

#### 4.6.2.4. MNC

Die Telomeraseaktivität in den MNC der Milz wies keinen Anhalt für einen regulatorischen Effekt auf ( $101\pm 43\%$ ). Die Telomerlänge stellte sich hingegen gesteigert dar ( $174\pm 3\%$ ;  $p < 0,05$ ). Der operativ induzierte MI zeigte keine signifikanten Effekte auf die Proteinexpression von TRF2 ( $84\pm 39\%$ ) (Abbildung 22). Dies spricht deutlich dafür, dass in der Infarktsituation aus den hämatopoetischen Organen (bei der Maus Knochenmark, Leber und Milz) Zellen (Stammzellen, Entzündungszellen) mit längeren Telomeren ausgeschüttet werden, passend zum bekannten zeitlichen Ablauf der Myokardheilung nach Infarkt.

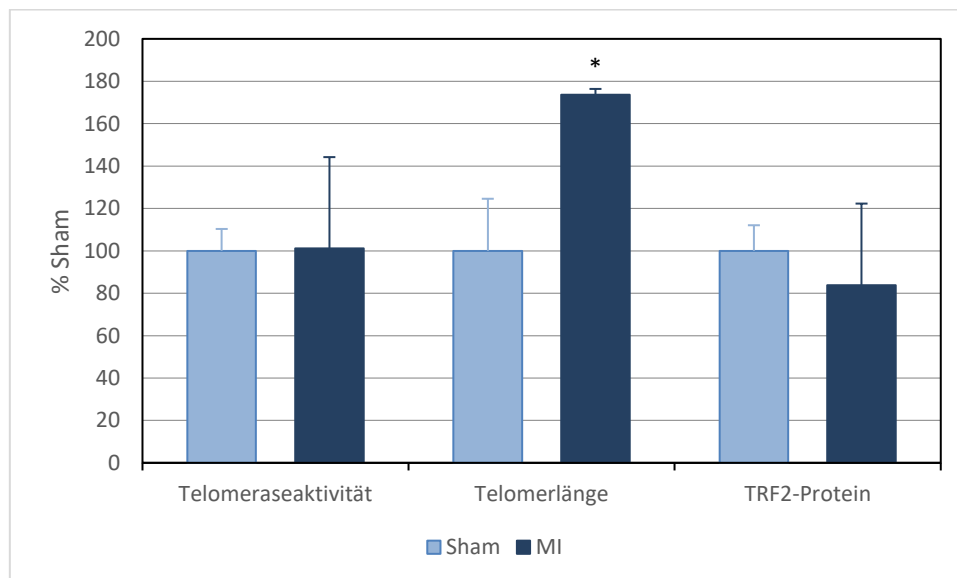


Abbildung 22: Darstellung der Telomeraseaktivität, Telomerlänge und TRF2-Proteinexpression in MNC 4 Wochen nach MI in WT-Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham (T-Test). MI: Myokardinfarkt; MNC: mononukleäre Zellen; WT: Wildtyp.

#### 4.6.2.5. Extrakardiale Regulation von Seneszenzmarkern, Apoptosemediatoren und Zellzyklusregulatoren 28 Tage nach Myokardinfarkt

#### 4.6.2.6. Aorta

Die Proteinexpression von p53 war in den Infarkttieren auf  $42\pm 39\%$  nicht signifikant vermindert. Simultan war in der Gefäßwand das p16-Protein tendenziell gesteigert ( $154\pm 47\%$ ). Ähnlich wie bei der Analyse der aortalen Telomerbiologie wiesen die

Messergebnisse auch hier eine große Streubreite auf (Abbildung 23). Weitere Untersuchungen fanden daher nicht statt.

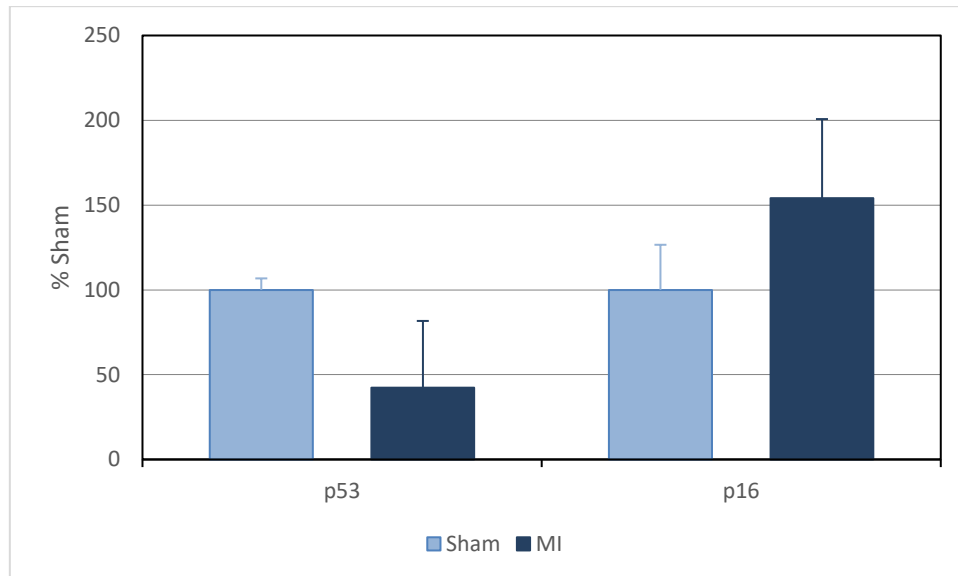


Abbildung 23: Darstellung der aortalen p53- und p16-Proteinexpression 4 Wochen nach MI in WT-Mäusen. MI: Myokardinfarkt; WT: Wildtyp.

#### 4.6.2.7. Leber

Im Lebergewebe waren die Ergebnisse homogener und besser verwertbar als im Aortengewebe, was sowohl an der Menge des pro Tier verfügbaren Materials als auch am Gewebe selbst liegen dürfte. Die Proteinexpression von p53 ( $135 \pm 25\%$ ) und Chk2 ( $141 \pm 7\%$ ) nicht signifikant gesteigert. Das Protein Bax zeigte sich hingegen mehr als das Dreifache exprimiert ( $387 \pm 33$ ;  $p < 0,05$ ). Für die Proteinexpression von pAkt lagen erniedrigte Werte vor ( $57 \pm 52\%$ ), allerdings ohne Signifikanz. Der Marker p16 ( $120 \pm 37\%$ ) war ebenfalls nicht signifikant reguliert, jedoch zeigten Western-Blot-Analysen eine gesteigerte Proteinexpression von SIRT1 ( $178 \pm 11\%$ ;  $p < 0,05$ ) (Abbildung 24).

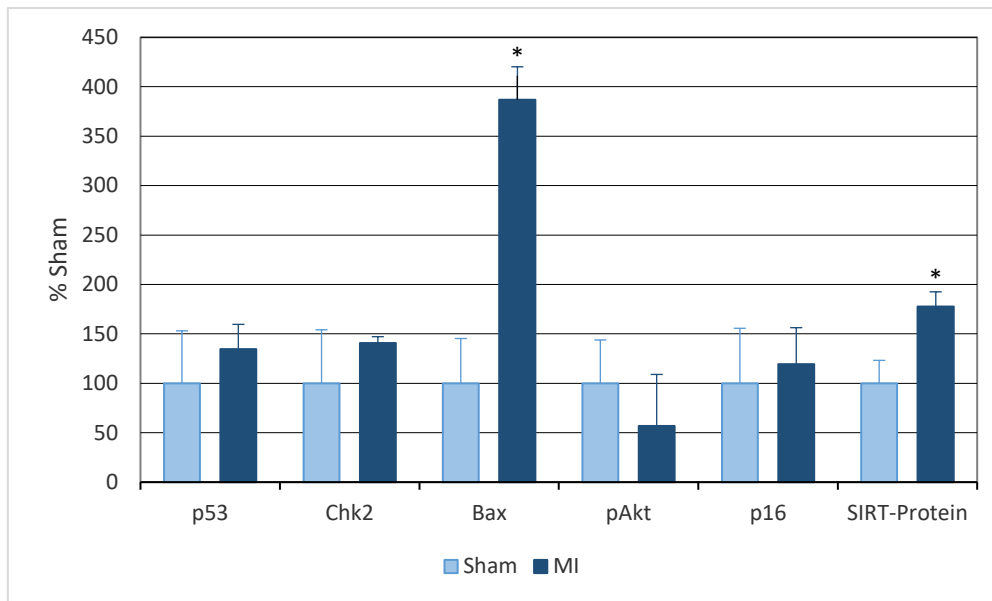


Abbildung 24: Darstellung der hepatischen Proteinexpression von p53, Chk2, Bax, pAkt, p16 und SIRT1 sowie der hepatischen Genexpression von SIRT1 4 Wochen nach MI in WT-Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham (T-Test). MI: Myokardinfarkt; WT: Wildtyp.

#### 4.6.2.8. MNC

In den MNC zeigte sich 4 Wochen nach MI keine signifikante Regulation der Proteinexpression von p53 ( $83 \pm 35\%$ ) und p16 ( $142 \pm 33\%$ ) (Abbildung 25). Bei hier sehr limitiertem Zellmaterial erfolgten keine weiteren Untersuchungen.

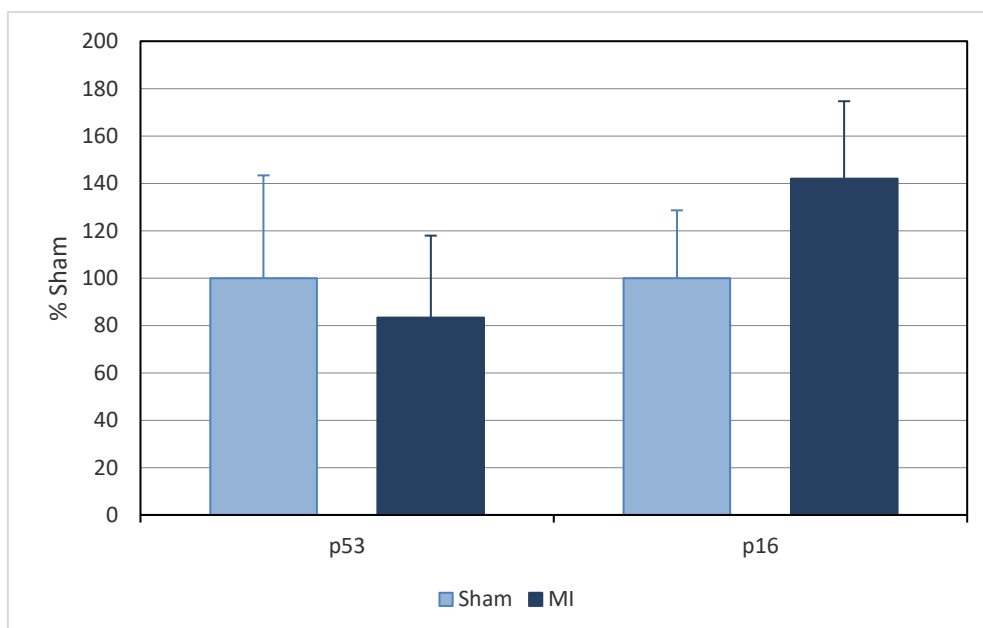


Abbildung 25: Darstellung der p53- und p16-Proteinexpression in MNC 4 Wochen nach MI in WT-Mäusen. MI: Myokardinfarkt; MNC: mononukleäre Zellen; WT: Wildtyp.

## 4.7. Kardiale und extrakardiale Effekte auf Telomerbiologie, Seneszenzmarker, Apoptose- und Zellzyklusregulatoren in $TERT^{-/-}$ -Mäusen 28 Tage nach Myokardinfarkt

### 4.7.1. Effekte auf kardiale Telomerlänge und Signaltransduktion

In der Gruppe der  $TERT^{-/-}$ -Mäuse alleine war die Länge der myokardialen Telomere in der RZ und IZ der Infarkttiere im Vergleich zu Sham RZ nicht signifikant reduziert (RZ:  $63 \pm 24\%$ ; IZ:  $75 \pm 1\%$ ). Beim Vergleich zwischen Wildtyp- (+/+) und Knockout- (-/-) Genotyp zeigten sich jedoch in den Infarktmäusen mit TERT-Defizienz kürzere Telomere ( $68 \pm 15\%$ ), aber nicht in den  $TERT^{-/-}$ -Shammäusen ( $117 \pm 29\%$ ). Vergleichbar zur C57Bl/6N Gruppe (Abbildung 9) ließen sich im Herzgewebehomogenat also längere Telomere messen. Die Proteinexpression von TRF2 war in den  $TERT^{-/-}$ -Mäusen lediglich in der IZ tendenziell erniedrigt ( $43 \pm 39\%$ ), allerdings war die TRF2-Expression in den Tieren mit TERT-Defizienz tendenziell höher als im Vergleich zu den WT-Kontrollen (Sham  $TERT^{-/-}$ :  $157 \pm 27\%$ ;  $p < 0,05$ ; MI  $TERT^{-/-}$ :  $121 \pm 35\%$ ) (Abbildungen 26 & 27).

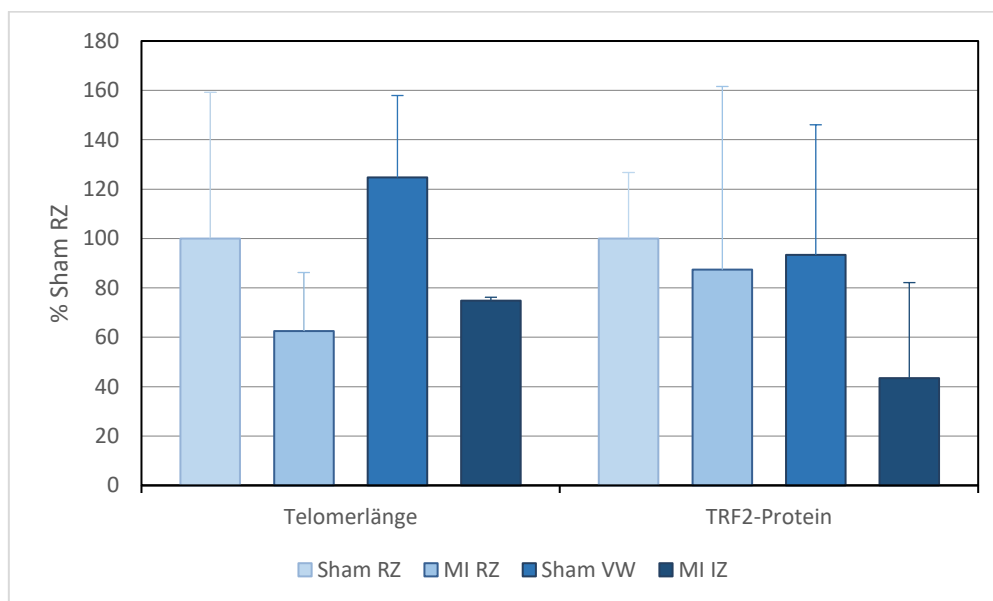


Abbildung 26: Darstellung der myokardialen Telomerlänge und TRF2-Proteinexpression 4 Wochen nach MI in  $TERT^{-/-}$ -Mäusen. IZ: Infarktzone; MI: Myokardinfarkt; RZ: Randzone; TERT: Telomerase-Reverse-Transkriptase; VW: Vorderwand.

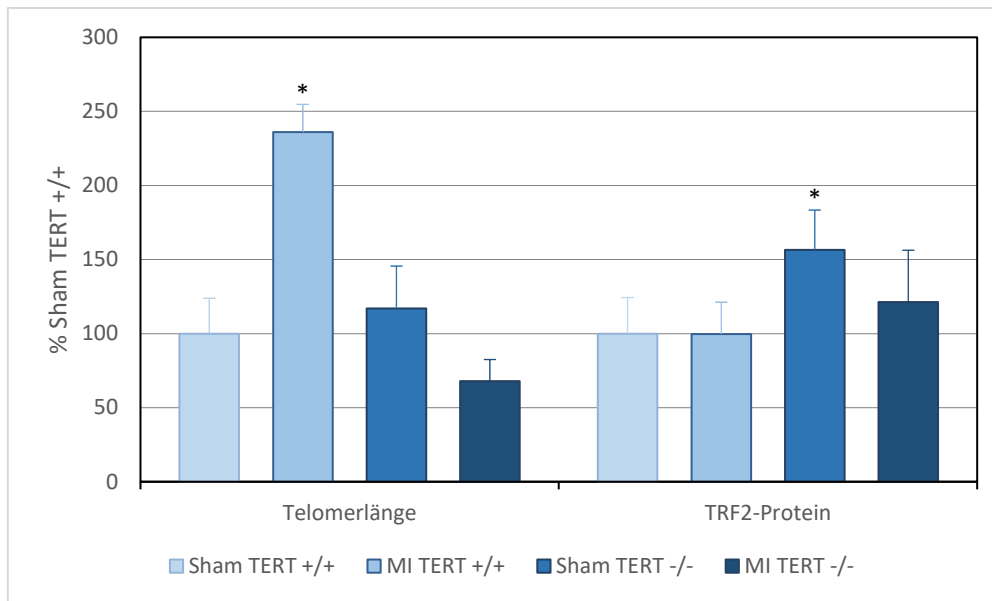


Abbildung 27: Darstellung der myokardialen Telomerlänge und TRF2-Proteinexpression 4 Wochen nach MI in TERT<sup>+/+</sup>- und TERT<sup>-/-</sup>-Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham TERT<sup>+/+</sup> (ANOVA). TERT: Telomerase-Reverse-Transkriptase.

Die Marker p53 (IZ:  $113 \pm 55\%$ ; RZ:  $109 \pm 74\%$ ) und Chk2 (IZ:  $64 \pm 39\%$ ; RZ:  $117 \pm 52\%$ ) wiesen in den TERT<sup>-/-</sup>-Infarkttieren keine signifikante Regulation auf. Bax hingegen zeigte sich in der IZ signifikant gesteigert (IZ:  $264 \pm 25\%$ ;  $p < 0,05$ ; RZ:  $158 \pm 51\%$ ). Eine Tendenz zu Herunterregulation von pAkt war in der IZ, nicht aber in der RZ, zu verzeichnen (IZ:  $63 \pm 30\%$ , RZ:  $99 \pm 22\%$ ). Die Proteinexpression von p16 war in der IZ deutlich vermindert nachweisbar ( $17 \pm 40\%$ ;  $p < 0,05$ ), in der RZ war keine Regulation festzustellen ( $112 \pm 34\%$ ). In der VW der Shamtiere fand sich eine signifikante Steigerung ( $p < 0,05$ ) von p53 ( $219 \pm 34\%$ ) und Bax ( $194 \pm 23\%$ ) und eine signifikante Verringerung ( $p < 0,05$ ) von pAkt ( $25 \pm 30\%$ ) und p16 ( $7 \pm 17\%$ ), verglichen mit dem restlichen Myokard, was bisher nicht erklärbar ist (Abbildung 28).

Im Vergleich zu den WT-Kontrolltieren ohne TERT-Defizienz war p53 (Sham:  $23 \pm 27\%$ ;  $p < 0,05$ ; MI:  $24 \pm 36\%$ ;  $p < 0,05$ ) in TERT<sup>-/-</sup> signifikant herunterreguliert. Bax (Sham:  $60 \pm 16\%$ ; MI:  $66 \pm 15\%$ ), Chk2 (Sham:  $96 \pm 39\%$ ; MI:  $71 \pm 44\%$ ) und pAKT (Sham:  $74 \pm 16\%$ ; MI:  $116 \pm 20\%$ ) hingegen zeigten bloß eine tendenziell reduzierte Proteinexpression. Der Seneszenzmarker p16 war jedoch in den Mäusen mit TERT-Defizienz ungefähr um etwa das Zweifache erhöht nachweisbar (Sham:  $189 \pm 47\%$ ;  $p < 0,05$ ; MI:  $205 \pm 42\%$ ;  $p < 0,05$ ). Auch in den WT-Kontrollen mit Infarkt war eine deutliche Steigerung der Proteinexpression von p16 zu verzeichnen ( $263 \pm 24\%$ ;  $p < 0,05$ ) (Abbildung 29).



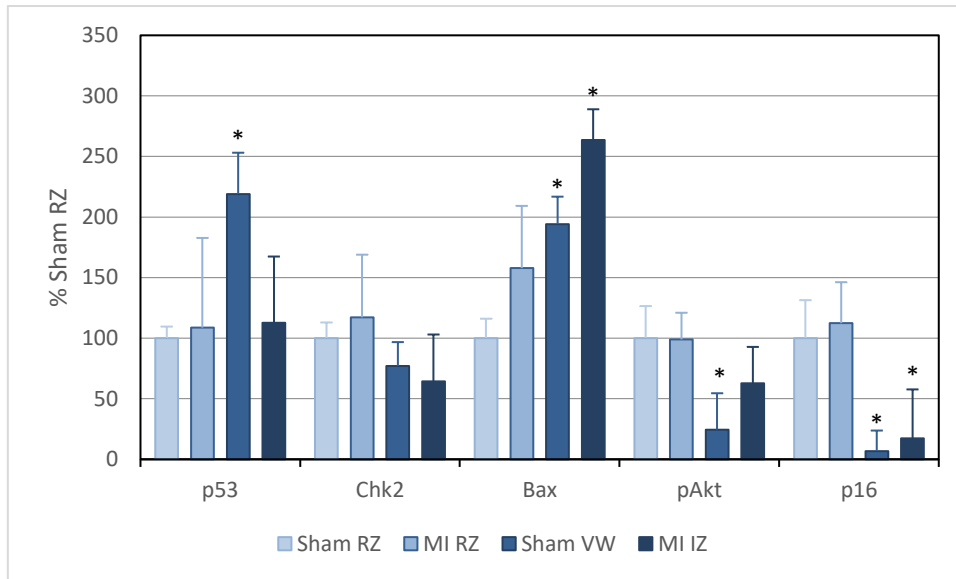


Abbildung 28: Darstellung der myokardialen p53-, Chk2, Bax-, pAkt-, und p16-Proteinexpression 4 Wochen nach MI in  $TERT^{-/-}$ -Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. RZ (ANOVA). IZ: Infarktzone; MI: Myokardinfarkt; RZ: Randzone; TERT: Telomerase-Reverse-Transkriptase; VW: Vorderwand.

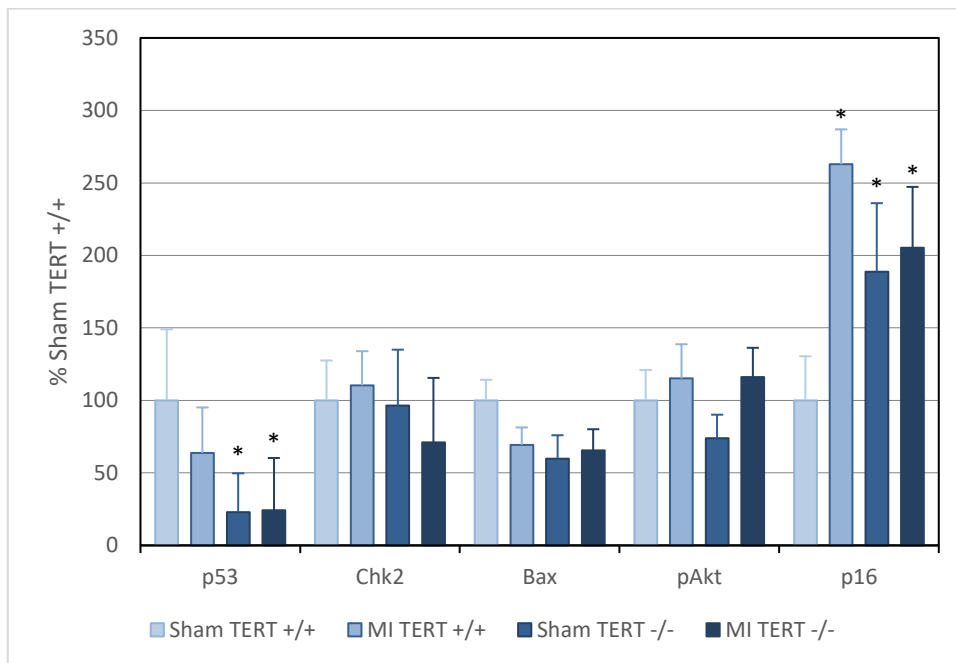


Abbildung 29: Darstellung der myokardialen p53-, Chk2, Bax-, pAkt-, und p16-Proteinexpression 4 Wochen nach MI in  $TERT^{+/+}$ - und  $TERT^{-/-}$ -Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham  $TERT^{+/+}$  (ANOVA). IZ: Infarktzone; MI: Myokardinfarkt; RZ: Randzone; TERT: Telomerase-Reverse-Transkriptase; VW: Vorderwand.

## 4.7.2. Effekte auf extrakardiale Signaltransduktion

### 4.7.2.1. Extrakardiale Regulation der Signaltransduktion, Telomerlänge und telomerstabilisierender Proteine 28 Tage nach MI

#### 4.7.2.1.1. Aorta

Die PCR-Untersuchung der Telomerlänge in  $TERT^{+/+}$  vs.  $TERT^{-/-}$  hat a.e. materialbedingt keine sinnvoll auswertbare Standardkurve geliefert. Die TRF2-Proteinexpression wies bei  $TERT^{-/-}$ -Mäusen keinen Anhalt für eine Regulation zwischen Scheinoperation und LAD-Ligatur auf ( $103 \pm 74\%$ ). Im Vergleich zu den WT-Kontrollen ohne TERT-Defizienz was das TRF2-Protein erhöht (Sham:  $171 \pm 14\%$ ;  $p < 0,05$ ; MI:  $176 \pm 74\%$ ) (Abbildungen 30 & 31). Generell waren auch in diesen Gruppen bei dem Aortengewebe kaum Signifikanzen aufgrund der hohen Streubreite zu verzeichnen.

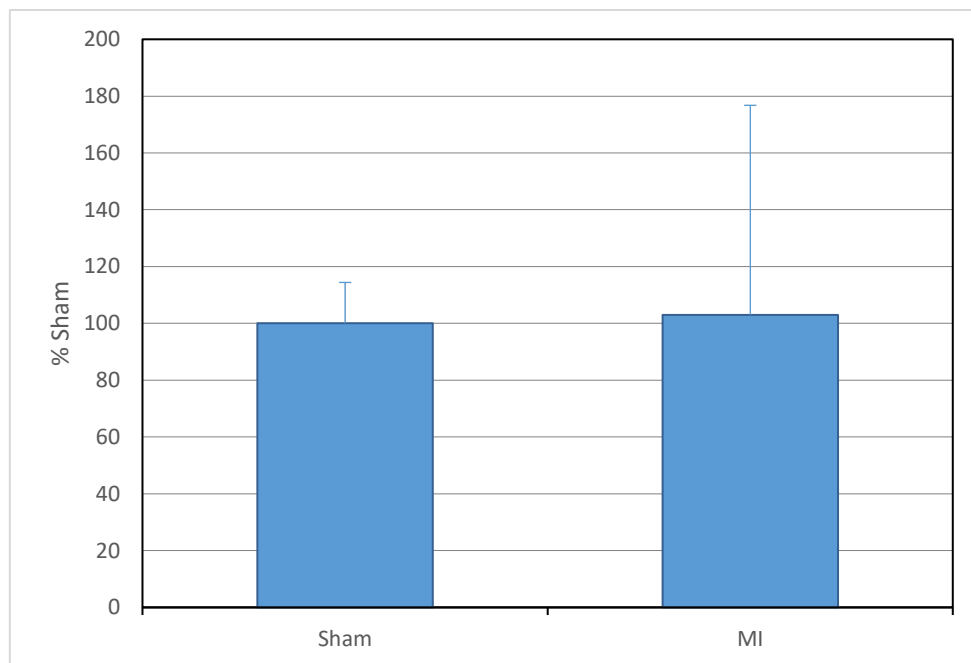


Abbildung 30: Darstellung der aortalen TRF2-Proteinexpression 4 Wochen nach MI in  $TERT^{-/-}$ -Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham  $TERT^{+/+}$  (ANOVA). MI: Myokardinfarkt; TERT: Telomerase-Reverse-Transkriptase.

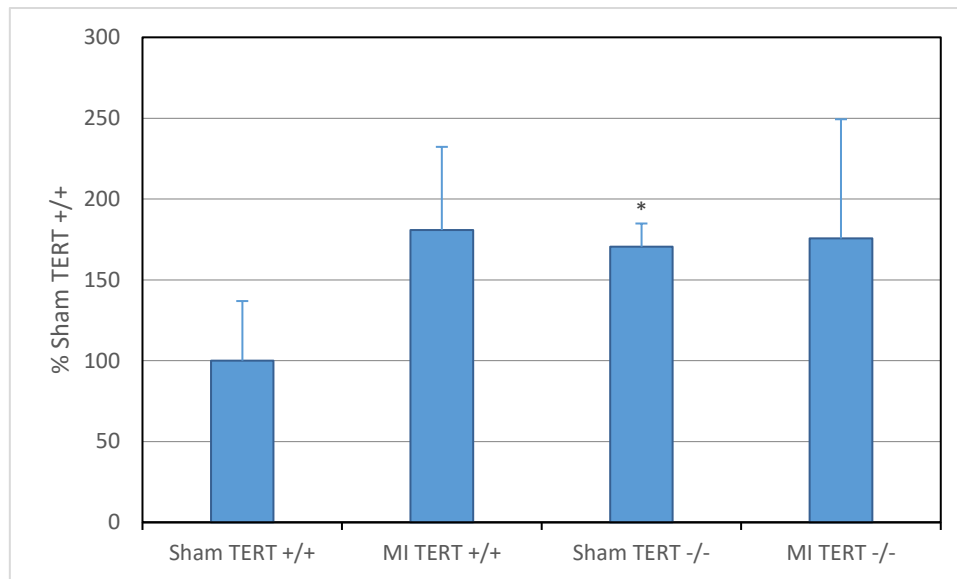


Abbildung 31: Darstellung der aortalen TRF2-Proteinexpression 4 Wochen nach MI der  $TERT^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu  $TERT^{+/+}$ -Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham  $TERT^{+/+}$  (ANOVA). MI: Myokardinfarkt; TERT: Telomerase-Reverse-Transkriptase.

#### 4.7.2.1.2. Leber

Die Telomerlänge der  $TERT^{-/-}$ -Infarktmäuse war im Vergleich zu den  $TERT^{-/-}$ -Shammäusen nicht signifikant reguliert ( $111 \pm 41\%$ ). Gegenüber den WT-Kontrollen mit Scheinoperation zeigte sich die Länge der Telomere in sämtlichen anderen Gruppen allerdings signifikant kürzer (MI  $TERT^{+/+}$ :  $46 \pm 31\%$ ;  $p < 0,05$ ; Sham  $TERT^{-/-}$ :  $31 \pm 21\%$ ;  $p < 0,05$ ; MI  $TERT^{-/-}$ :  $35 \pm 41\%$ ;  $p < 0,05$ ). Die Messung der TRF2-Proteinexpression ergab, ähnlich wie in der Gefäßwand, keine signifikanten Effekte bei induziertem Infarkt im Knockout-Stamm (MI  $TERT^{-/-}$  vs. Sham  $TERT^{-/-}$ :  $91 \pm 50\%$ ). Auch im Vergleich zu den  $TERT^{+/+}$ -Kontrollen fanden sich keine Unterschiede (Abbildungen 32 & 33).

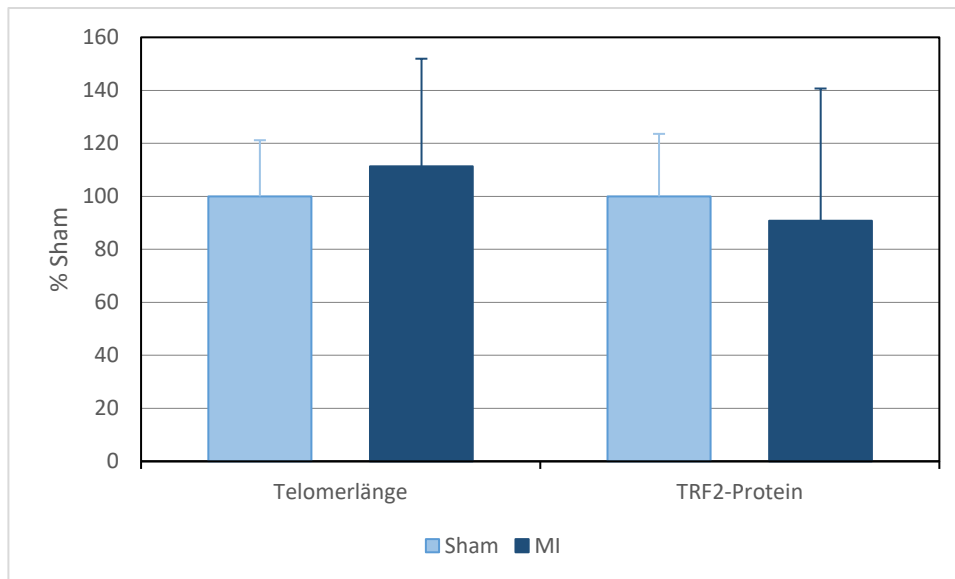


Abbildung 32: Darstellung der hepatischen Telomerlänge und TRF2-Proteinexpression 4 Wochen nach MI in  $TERT^{-/-}$ -Mäusen. MI: Myokardinfarkt; TERT: Telomerase-Reverse-Transkriptase.

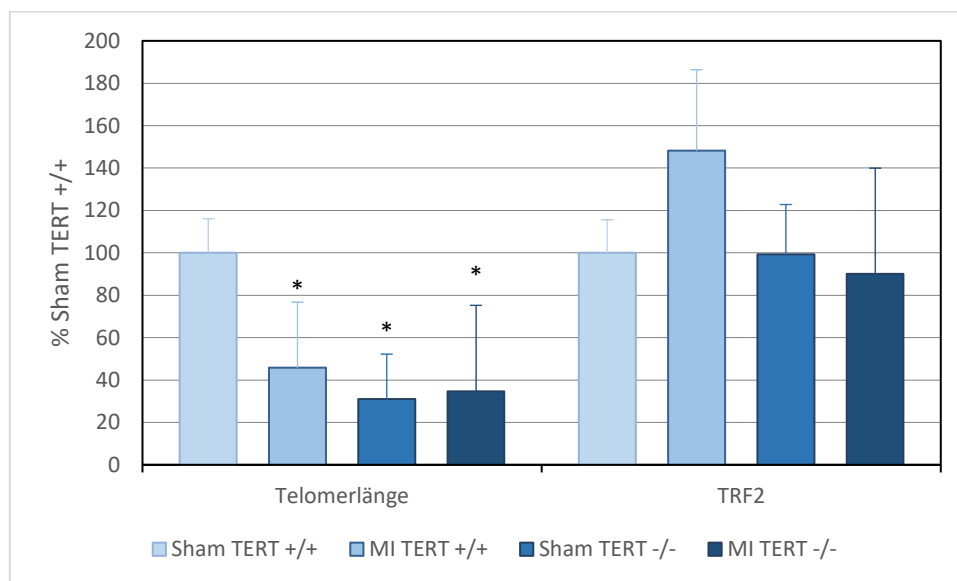


Abbildung 33: Darstellung der hepatischen Telomerlänge und TRF2-Proteinexpression 4 Wochen nach MI in  $TERT^{+/+}$ - und  $TERT^{-/-}$ -Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham  $TERT^{+/+}$  (ANOVA). MI: Myokardinfarkt; TERT: Telomerase-Reverse-Transkriptase.

#### 4.7.2.1.3. MNC

In den MNC stellten sich die Telomere nach Infarkt nicht signifikant verkürzt dar ( $51 \pm 36\%$ ). Dieses Ergebnis war im Vergleich zu den WT-Kontrollen ebenfalls zu sehen (Sham:  $81 \pm 8\%$ ; MI:  $41 \pm 36\%$ ). Die Telomerlänge war in den TERT-positiven Kontrolltieren mit LAD-Ligatur allerdings deutlich gesteigert ( $174 \pm 3\%$ ;  $p < 0,05$ ),

vergleichbar mit dem Ergebnis aus C57Bl/6N (Abbildung 22). TRF2 war in den  $TERT^{-/-}$ -Infarktmäusen bloß tendenziell vermindert nachweisbar ( $71\pm 23\%$ ) mit deutlicher verminderter Expression im Vergleich zur  $TERT^{+/+}$ -Shamgruppe (Sham:  $46\pm 37\%$ ; MI:  $33\pm 23\%$ ;  $p < 0,05$ ) (Abbildungen 34 & 35).

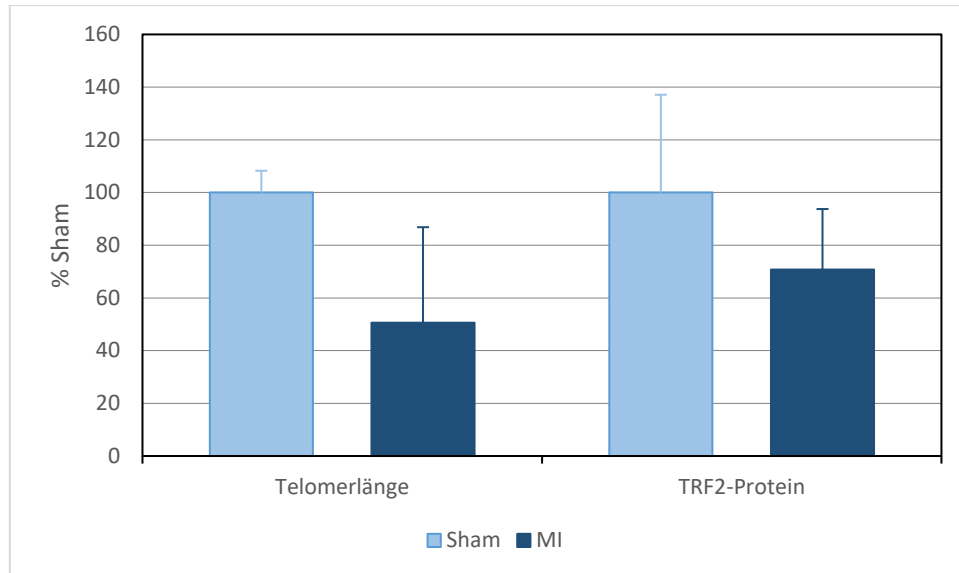


Abbildung 34: Darstellung der Telomerlänge und TRF2-Proteinexpression in MNC 4 Wochen nach MI in  $TERT^{-/-}$ -Mäusen. MI: Myokardinfarkt; MNC: mononukleäre Zellen; TERT: Telomerase-Reverse-Transkriptase.

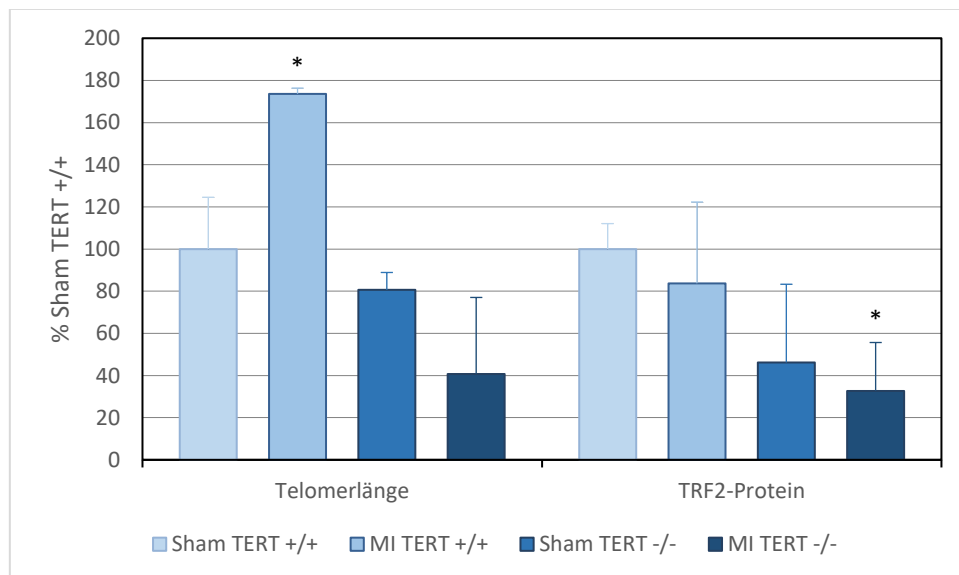


Abbildung 35: Darstellung der Telomerlänge und TRF2-Proteinexpression in MNC 4 Wochen nach MI in  $TERT^{+/+}$ - und  $TERT^{-/-}$ -Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham  $TERT^{+/+}$  (ANOVA). MI: Myokardinfarkt; MNC: mononukleäre Zellen; TERT: Telomerase-Reverse-Transkriptase.

#### 4.7.2.2. Extrakardiale Regulation der enzymatischen Aktivität der Seneszenzmarker, Apoptosemediatoren und Zellzyklusregulatoren 28 Tage nach MI

##### 4.7.2.2.1. Aorta

In der Gefäßwand zeigte sich kein Effekt auf die Regulation der Proteinexpression von p53 in den Infarktmäusen mit TERT-Defizienz im Vergleich zu den scheinoperierten TERT<sup>-/-</sup>-Mäusen (107±54%) und im Vergleich zu den WT-Kontrollen (Sham: 88±57%; MI: 95±54%). Die Proteinexpression von p16 hingegen war zwar tendenziell reduziert (60±33%), jedoch fand sich im Vergleich zu den TERT<sup>+/+</sup> Shammäusen eine Steigerung in der Knockout-Shamgruppe (210±7%; p<0,05), aber nicht bei den Infarkttieren (126±33%) (Abbildungen 36 & 37).

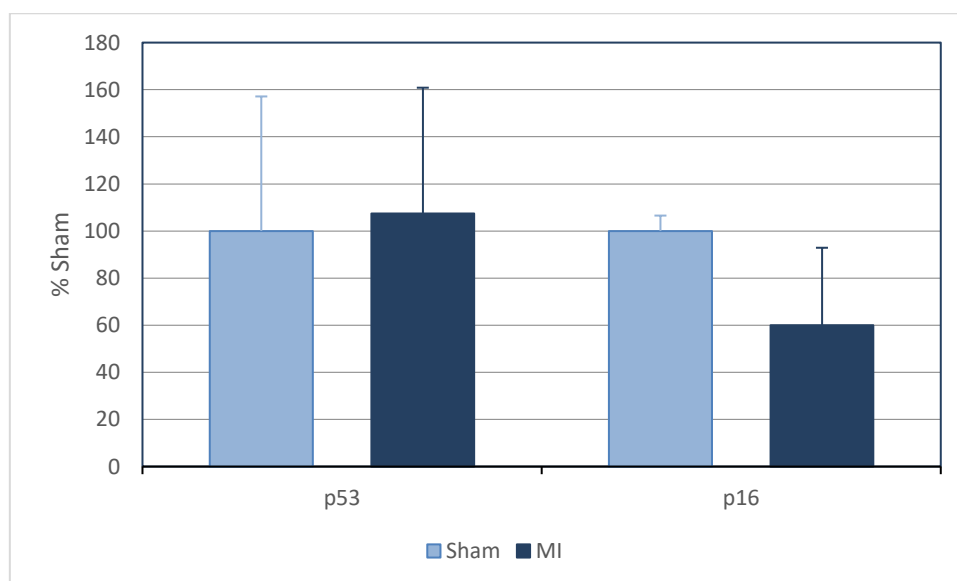


Abbildung 36: Darstellung der aortalen p53- und p16-Proteinexpression 4 Wochen nach MI in TERT<sup>-/-</sup>-Mäusen. MI: Myokardinfarkt; TERT: Telomerase-Reverse-Transkriptase.

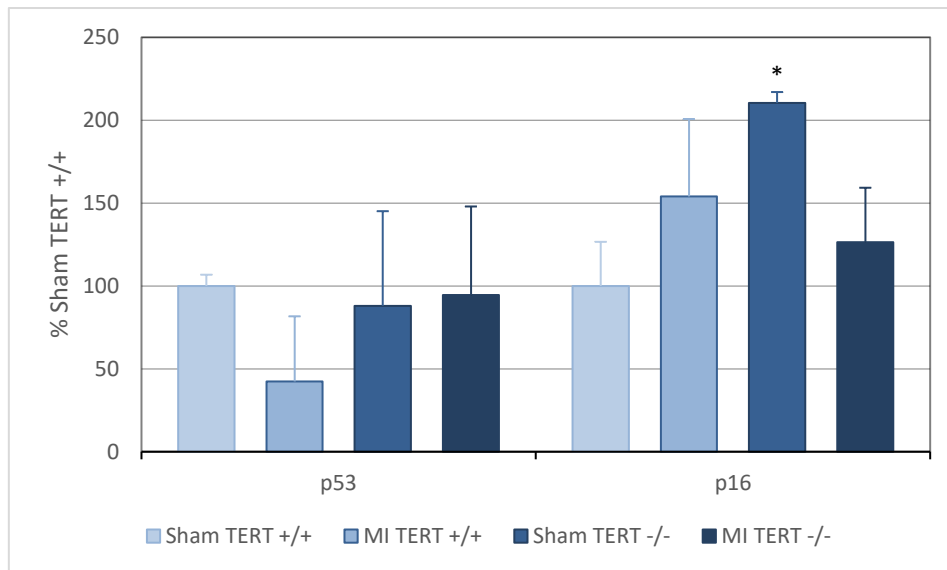


Abbildung 37: Darstellung der aortalen p53- und p16-Proteinexpression 4 Wochen nach MI in TERT<sup>+/+</sup>- und TERT<sup>-/-</sup>-Mäusen. \*p<0,05 vs. Sham TERT<sup>+/+</sup> (ANOVA). MI: Myokardinfarkt; TERT: Telomerase-Reverse-Transkriptase.

#### 4.7.2.2.2. Leber

Im Lebergewebe der TERT<sup>-/-</sup>-Infarktmäuse waren p53 (53±45%) und Chk2 (184±70%) nicht signifikant gegensätzlich nach Infarkt reguliert. Durch die hohe Streuung der Werte waren p53 und Chk2 gegenüber den WT-Kontrollen ebenfalls nicht signifikant verändert (p53: Sham: 49±13%; MI: 26±45%; Chk2: Sham: 62±21%; MI: 114±70%). Bax (239±42%, p<0,05) und pAKT (205±31%; p<0,05) wiesen beide in den TERT<sup>-/-</sup>-Tieren mit MI eine erhöhte Expression auf. Im direkten Vergleich zu den WT-Kontrollen zeigte sich, dass dieser Effekt nur für Bax konsistent war (Bax: Sham 144±36%; MI 343±42%, p<0,05; pAkt: Sham: 32±54%; MI: 66±31%). Der geringe Anstieg der p16-Proteinexpression in den Infarktmäusen war nicht signifikant (126±56%) mit ähnlicher Tendenz im Vergleich zu der Kontrollgruppe Sham TERT +/+ (Sham: 72±19%; MI: 90±56%). Die Expression des Proteins SIRT1 war auf 179±20% erhöht (p<0,05). Dies galt ebenfalls im Vergleich zu den WT-Kontrolltieren (Sham<sup>-/-</sup>: 98±47%; MI<sup>-/-</sup>: 176±20%; p<0,05) (Abbildungen 38 & 39).

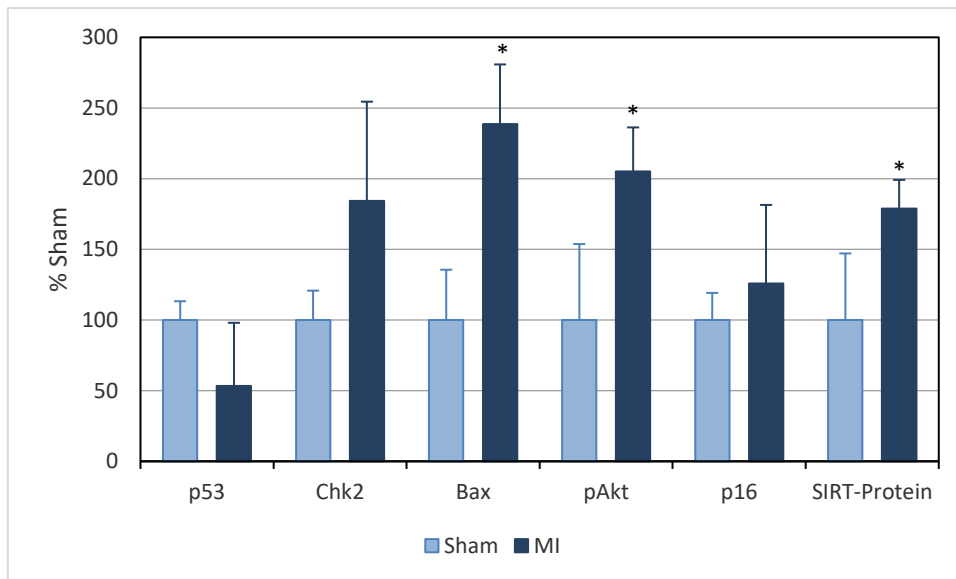


Abbildung 38: Darstellung der hepatischen p53-, Chk2-, Bax-, pAkt-, p16-, SIRT1-Proteinexpression 4 Wochen nach MI in  $TERT^{-/-}$ -Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham  $TERT^{+/+}$  (T-Test). MI: Myokardinfarkt; TERT: Telomerase-Reverse-Transkriptase.

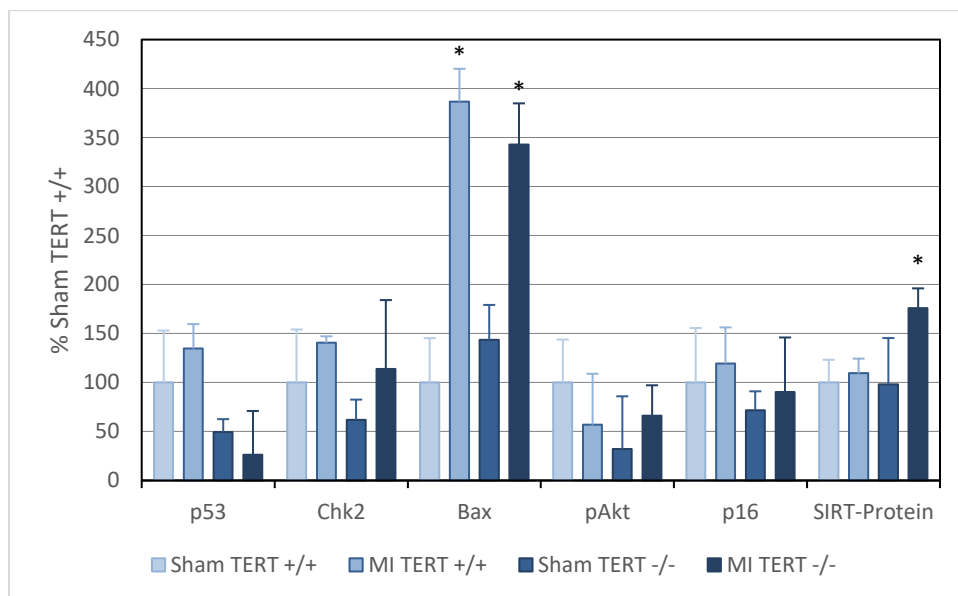


Abbildung 39: Darstellung der hepatischen p53-, Chk2-, Bax-, pAkt-, p16-, SIRT1-Proteinexpression 4 Wochen nach MI in  $TERT^{+/+}$ - und  $TERT^{-/-}$ -Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham  $TERT^{+/+}$  (ANOVA). MI: Myokardinfarkt; TERT: Telomerase-Reverse-Transkriptase.

#### 4.7.2.2.3. MNC

Die Expressionsanalyse von p53 ergab tendenziell erhöhte Werte in den MNC ( $144 \pm 43\%$ ). Im Vergleich zu den Kontrolltieren war die p53-Proteinexpression tendenziell erniedrigt (Sham:  $59 \pm 31\%$ ; MI:  $85 \pm 43\%$ ). Die Defizienz von TERT in



Knockout-Mäusen ging in unseren Versuchen mit einer gesteigerten Proteinexpression von p16 in den Infarktieren einher ( $155 \pm 12\%$ ,  $p < 0,05$ ). Der Vergleich zu den WT-Kontrollmäusen ergab eine signifikante Reduktion von p53 (Sham:  $30 \pm 12\%$ ;  $p < 0,05$ ; MI:  $46 \pm 12\%$ ;  $p < 0,05$ ) (Abbildungen 40 & 41).

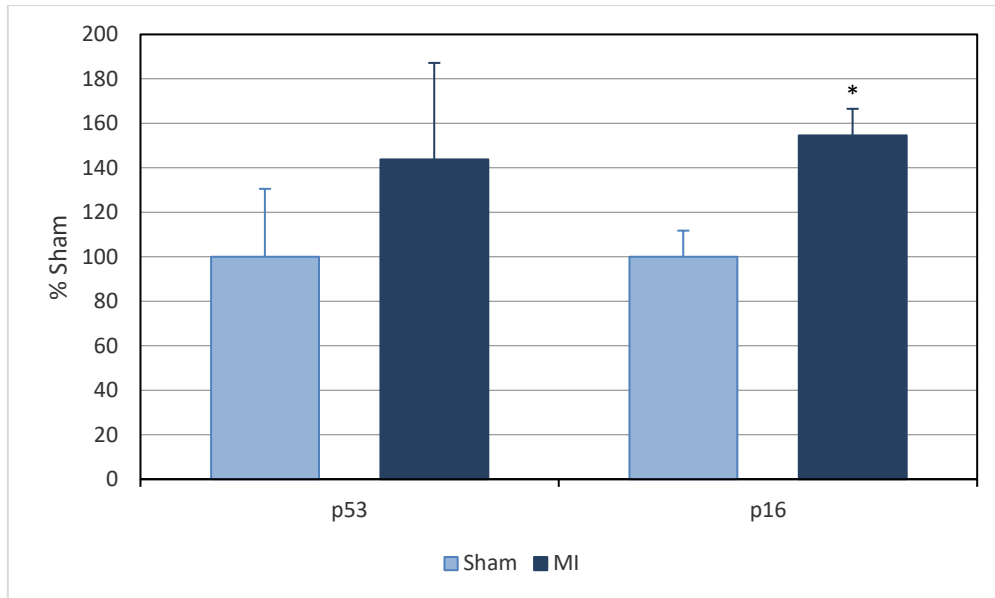


Abbildung 40: Darstellung p53- und p16-Proteinexpression im MNC 4 Wochen nach MI in  $TERT^{-/-}$ -Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham (T-Test). MI: Myokardinfarkt; MNC: mononukleäre Zellen; TERT: Telomerase-Reverse-Transkriptase.

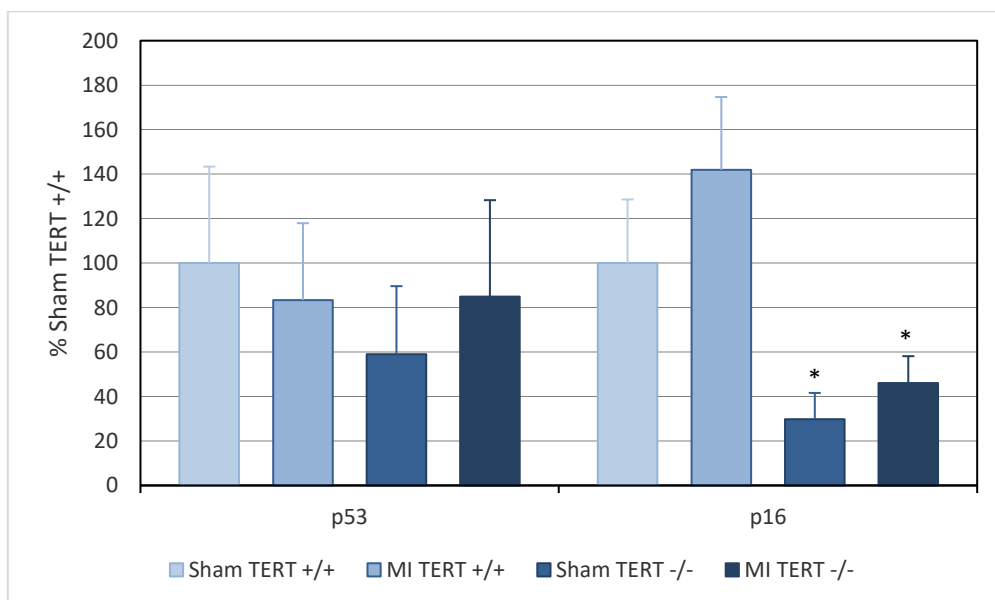
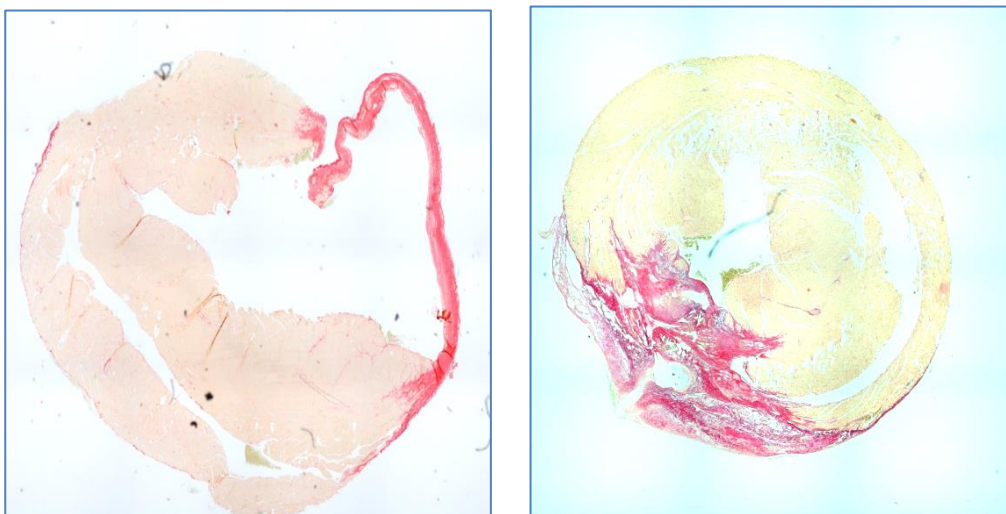


Abbildung 41: Darstellung p53- und p16-Proteinexpression im MNC 4 Wochen nach MI in  $TERT^{+/+}$ - und  $TERT^{-/-}$ -Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham  $TERT^{+/+}$  (ANOVA). MI: Myokardinfarkt; MNC: mononukleäre Zellen; TERT: Telomerase-Reverse-Transkriptase.

#### 4.8. Histologische und molekularbiologische Untersuchung der Myokardfibrose in TERT<sup>+/+</sup>- und TERT<sup>-/-</sup>-Mäusen

Die histologischen Untersuchungen bestätigten die induzierte Infarktbildung in sämtlichen Tieren 4 Wochen nach proximaler LAD-Ligatur. *Abbildung 42* zeigt exemplarisch einen bereits visuell deutlichen Unterschied hinsichtlich der Menge an Infarkt Narbe zwischen TERT<sup>+/+</sup>- und TERT<sup>-/-</sup>-Infarktmäusen. Die prozentuale Fläche des fibrotischen im Verhältnis zum nicht-fibrotischen Myokardgewebe in der mikroskopischen Auswertung der histologischen Herzgewebeschnitte nach *Sirius Red*-Färbung betrug dabei in den TERT<sup>+/+</sup>-Infarkttieren  $1,52 \pm 0,84\%$  ( $p < 0,05$ ) und in den TERT<sup>-/-</sup>-Infarkttieren  $8,21 \pm 3,05\%$  ( $p < 0,05$ ) (*Abbildung 43*), was einer mehr als fünffachen Steigerung entspricht (*Abbildung 44*). Im Vergleich zu den Shamtieren konnte damit auch die erfolgreiche Durchführung des MI mit Induktion einer Narbe im Sinne einer regionalen Myokardfibrose im LAD-Stromgebiet bestätigt werden (TERT<sup>+/+</sup> MI vs. Sham:  $2.222 \pm 55\%$ ;  $p < 0,05$ ; TERT<sup>-/-</sup> MI vs. Sham:  $11.982 \pm 37\%$ ;  $p < 0,05$ ). Eine weitere Analyse verifiziert diese Observation, da sich eine höhere Genexpression von Collagen-1 $\alpha$ , insbesondere in den TERT-Knockoutmäusen mit Infarkt im Vergleich zu den WT-Shamtieren, zeigte (TERT<sup>+/+</sup>  $312 \pm 25\%$ ;  $p < 0,05$ ; TERT<sup>-/-</sup>  $450 \pm 34\%$ ;  $p < 0,05$ ) (*Abbildung 45*). Ein zweiter bedeutender Regulator der myokardialen Fibrose, CTGF [132], zeigte einen noch deutlicheren pro-fibrotischen Effekt bei den TERT-defizienten Mäusen nach LAD-Ligatur (TERT<sup>+/+</sup>  $388 \pm 50\%$ ;  $p < 0,05$ ; TERT<sup>-/-</sup>  $1.366 \pm 43\%$ ;  $p < 0,05$ ) (*Abbildung 46*).



*Abbildung 42: Abbildung eines mittmyokardialen Schnittes nach Sirius Red-Färbung in einer TERT<sup>+/+</sup>- (links) und TERT<sup>-/-</sup>-Maus (rechts) 4 Wochen nach MI. MI: Myokardinfarkt; TERT: Telomerase-Reverse-Transkriptase*

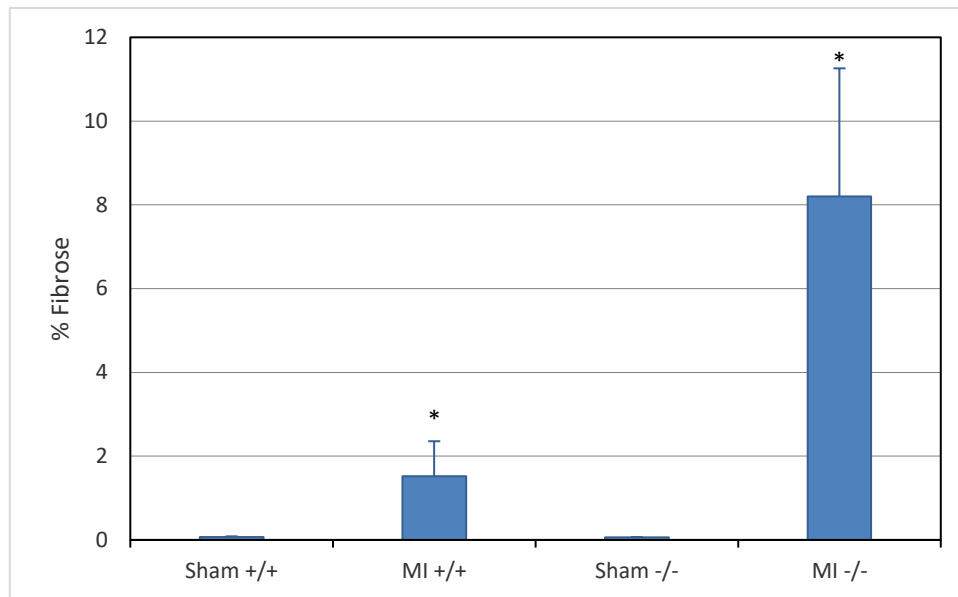


Abbildung 43: Darstellung der prozentualen myokardialen Fibrose 4 Wochen nach MI in  $TERT^{+/+}$ - und  $TERT^{-/-}$ -Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham  $TERT^{+/+}$  (ANOVA). # $p < 0,05$  vs. Sham  $TERT^{-/-}$  (ANOVA). MI: Myokardinfarkt; TERT: Telomerase-Reverse-Transkriptase.

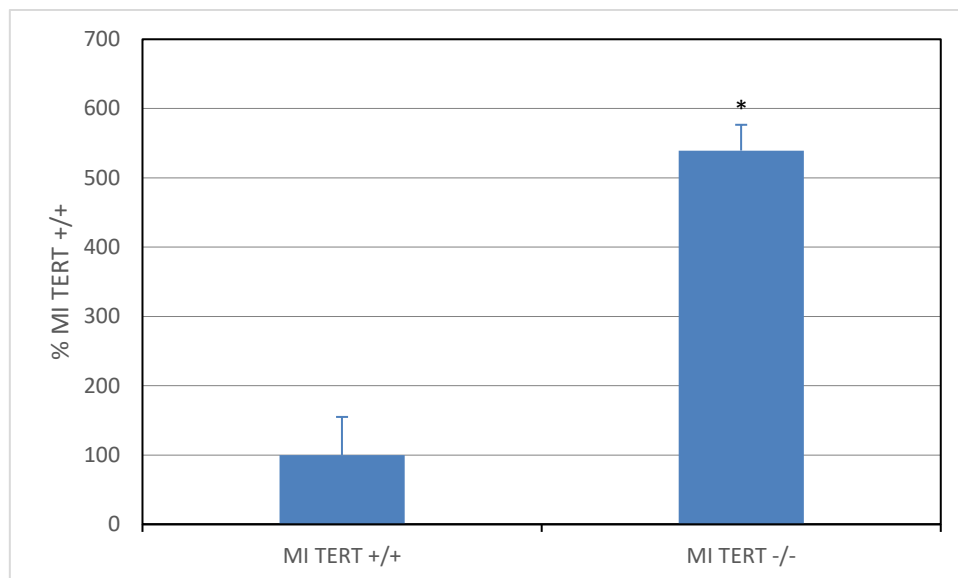


Abbildung 44: Darstellung der myokardialen Fibrose 4 Wochen nach MI in  $TERT^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu  $TERT^{+/+}$ -Infarktmäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham  $TERT^{+/+}$  (T-Test). MI: Myokardinfarkt; TERT: Telomerase-Reverse-Transkriptase.

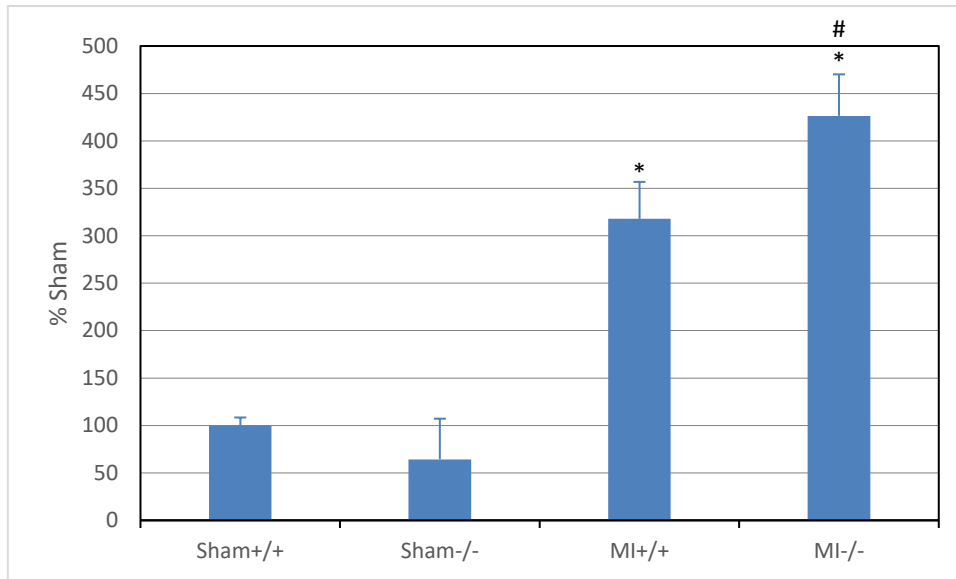


Abbildung 45: Darstellung der myokardialen Collagen-1 $\alpha$ -mRNA-Expression 4 Wochen nach MI in TERT<sup>+/+</sup>- und TERT<sup>-/-</sup>-Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham TERT<sup>+/+</sup> (ANOVA). # $p < 0,05$  vs. Sham TERT<sup>-/-</sup> (ANOVA). MI: Myokardinfarkt; mRNA: messenger Ribonukleinsäure; TERT: Telomerase-Reverse-Transkriptase.

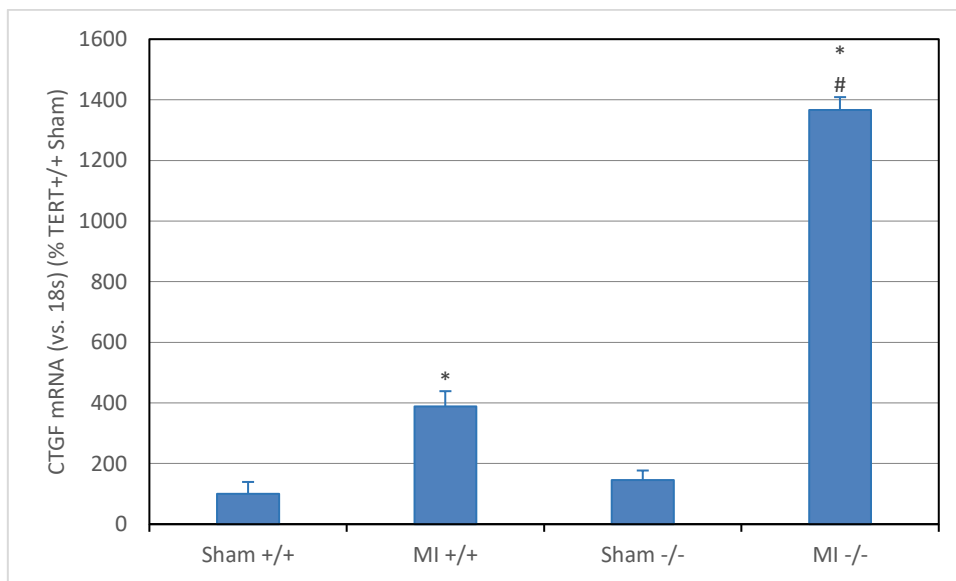


Abbildung 46: Darstellung der myokardialen CTGF-mRNA-Expression 4 Wochen nach MI in TERT<sup>+/+</sup>- und TERT<sup>-/-</sup>-Mäusen. \* $p < 0,05$  vs. Sham TERT<sup>+/+</sup> (ANOVA). # $p < 0,05$  vs. Sham TERT<sup>-/-</sup> (ANOVA). CTGF: Connective Tissue Growth Factor; MI: Myokardinfarkt; mRNA: messenger Ribonukleinsäure; TERT: Telomerase-Reverse-Transkriptase.

## 5. Diskussion

Das Ziel dieser experimentellen Arbeit war die Untersuchung der Telomerbiologie und zellulären Seneszenz bei Ischämie-induzierten myokardialen Anpassungsprozessen ("Remodeling") im Mausmodell. Hierbei wurden in einem etablierten murinen Schadensmodell die Folgen einer kardialen Schädigung durch akut induzierte Infarktbildung mittels permanenter Ligatur der proximalen LAD auf organ- und zelltypspezifische Alterungsmechanismen untersucht. Zudem wurde im Myokard genauer analysiert, ob diese Effekte im zeitlichen Verlauf (Tag 3, 7 und 28 post-OP) unterschiedlich reguliert wurden. In genetisch veränderten Mäusen wurden die gleichen Untersuchungen vier Wochen nach Induktion des Myokardinfarktes durchgeführt, um einen Einfluss auf regulatorische Effekte durch globalen Knockout des katalytischen Anteiles der Telomerase-Reverse-Transkriptase (TERT) zu analysieren. Des Weiteren wurden histologische und funktionelle Parameter ermittelt, um deren Assoziation mit den molekularen Veränderungen zu überprüfen.

### 5.1. Kardiale Veränderungen auf molekularer Ebene

- **Die Induktion eines Myokardinfarktes führt zu einem zeit- und gebietsabhängigen Regulationsprozess der Telomerbiologie im Myokard.**

Die Telomerdysfunktion als Schlüsselfaktor bei kardiovaskulären Erkrankungen wurde bereits in verschiedenen Untersuchungen festgestellt [133-135]. Auch im Rahmen des akuten Myokardinfarktes wird der Telomerase eine kardioprotektive Wirkung zugeschrieben [136]. Des Weiteren inhibieren die telomer-assoziierten Proteine TERT und TRF2 den programmierten Zelltod [137, 138]. Die Beeinflussung der Telomere könnte daher eine wichtige Bedeutung für das myokardiale Remodeling nach kardialer Schädigung haben. Inwiefern diese Regulationen einem zeitlichen und gebietsabhängigen Muster nach MI folgen, wurde bisher nicht untersucht.

Entgegen unserer ursprünglichen Hypothese wurde bereits früh nach Induktion eines Herzinfarktes eine deutlich erhöhte Telomeraseaktivität im Gewebe festgestellt. Dabei stieg die enzymatische Aktivität der Telomerase an Tag 3 nach MI zunächst bloß

innerhalb der Infarkt- und nicht in der RZ an, während an Tag 7 und deutlicher noch an Tag 28 eine fortschreitende Zunahme in beiden Zonen zu verzeichnen war. In ähnlicher Weise zeigte sich eine passagere zeit- und gebietsabhängige Hochregulation des telomer-assoziierten Proteins TRF2 mit hier maximaler Proteinexpression eine Woche nach MI. Die Länge der Telomere war an Tag 28 in der RZ deutlicher gesteigert als in der infarzierten VW selbst, was, wie in Kapitel 5.5. beschrieben, mehrere Ursachen haben könnte, welche in zukünftigen Studien erforscht werden müssen. Insbesondere in welchen Zellenarten im Myokardgewebe diese Regulation genau stattfindet, und ob es sich nur um residente oder auch um aus dem Blutstrom migrierte Zellen handelt, bleibt zu klären.

Es wäre in Betracht zu ziehen, dass nicht irreversibel geschädigte Kardiomyozyten stimuliert werden und fortan proliferieren [92]. Zudem könnten während der Ischämie-induzierten Entzündungsreaktion in das geschädigte Myokard einströmende MNC, insbesondere Monozyten [139] und Leukozyten [140], für eine Erhöhung der Telomeraseaktivität im Gewebe verantwortlich sein. Eine weitere Möglichkeit wäre das Wachstum von vaskulären glatten Muskelzellen im Rahmen einer Hypoxie-induzierten Angiogenese, welches nachweislich mit der Aktivierung der Telomerase korreliert [141]. Man konnte zudem nachweisen, dass in ischämischen Rattenherzen eine Stammzelltransplantation durch endotheliale Progenitorzellen mit exogen transfektiertem humanem TERT-Gen die Angiogenese im Myokard fördert [142]. Eine weitere Möglichkeit stellen eingewanderte zirkulierende Fibroblasten dar.

- **Apoptosemediatoren, Zellzyklusregulatoren und Seneszenzmarker werden im ischämisch geschädigten Myokard ebenfalls zeit- und gebietsabhängig reguliert.**

Über die direkte Regulation der Telomerlänge hinaus sind Telomerase und telomer-assoziierte Proteine auch in die Regulation der DNA-Schadensreparatur und des Zellzyklus` involviert [50]. Parallel zur beschriebenen zeit- und gebietsabhängigen Regulation der Telomerbiologie werden Seneszenzmarker, Zellzyklusregulatoren und Apoptosemediatoren aktiviert. Die Regulation der prämaternen Seneszenz durch p53 sowie dessen Aktivierung durch Chk2 ist bereits hinlänglich bekannt [143, 144]. Einen weniger gut verstandenen Mechanismus weist der Marker p16 auf, welcher in

seneszenten Kardiomyozyten mit telomerischer Dysfunktion vermehrt exprimiert ist [71, 72].

Unsere Studienergebnisse zeigten, dass parallel zur gesteigerten Telomeraseaktivität eine vermehrte Proteinsynthese von p53 und Chk2 zunächst nur im Infarkttrandgebiet und zu späteren Zeitpunkten teils sowohl in der IZ als auch in der RZ stattfindet. Der Seneszenzmarker p16 war, ähnlich wie das TRF2-Protein, an Tag 7 nach Infarktinduktion am stärksten exprimiert und nach 4 Wochen in der Infarktzone immer noch erhöht, während TRF2 schon abgefallen war. Ursächlich hierfür könnten insbesondere seneszente kardiiale Fibroblasten sein, welche nach MI im Herzgewebe akkumulieren [129]. In der vorliegenden Arbeit war zudem eine teils verstärkte Expression des Bax-Proteins nachzuweisen, so dass ebenfalls eine Induktion der mitochondrialen Apoptose durch reaktive Sauerstoffspezies im Rahmen der Hypoxie durch den Infarkt, insbesondere in der IZ eine Woche nach Operation, vorlag. Simultan laufen aber auch Gegenregulationen zur Apoptose ab, was durch den Anstieg der Proteinexpression des anti-apoptotischen pAkt-Proteins verdeutlicht wird. Da sich unseren Ergebnissen zufolge dieser Prozess insbesondere früh nach MI abzuspielen scheint, vermuten wir, dass dieser Anstieg vorrangig durch den Einstrom inflammatorischer Zellen bedingt sein kann. Anhand der molekularbiologischen Veränderungen dieser vier Marker gehen wir davon aus, dass in unserem Schadensmodell eine Aussonderung von mutmaßlich irreversibel geschädigten Zellen im zeitlichen Verlauf stattfindet und dass dieser Prozess, bei ähnlicher Dynamik, mit der Veränderung der Telomere im Zusammenhang steht.

Trotz der Tendenz zum Zellzyklusstopp und zum programmierten Zellzyklus zeigte sich keine signifikante Regulation der Protein- und Genexpression der seneszenz-assoziierten GLB1 in beiden Zonen vier Wochen nach MI. Dies schließt allerdings eine Hochregulation dieses klassischen Seneszenzmarkers nicht aus, da hier die Direktfärbung zur histochemischen Detektion von GLB1 (SA-b-Gal-Färbung) den Vorzug hätte haben sollen – welche unsere Arbeitsgruppe jedoch nur aus ganz frischem Gewebe direkt im Anschluss an die Organexplantation hätte durchführen können, was logistisch nicht möglich war und für die Erkennung der zugrunde liegenden Mechanismen als nicht essentiell erachtet wurde. Eine tierexperimentelle Seneszenz-Studie [129] mit ebenfalls Durchführung einer permanenten proximalen LAD-Ligatur zeigte eine Woche nach Operation zwar auch eine myokardiale Erhöhung von p16 und p53, jedoch war der Marker GLB1 zu jenem Zeitpunkt simultan vermehrt

nachweisbar. Die Autoren schrieben dabei p53 einen essentiellen anti-fibrotischen Mechanismus aufgrund einer Reduktion der kardialen Kollagenproduktion durch Myofibroblasten zu. In einem anderem kardiovaskulären Schadensmodell detektierten Meyer *et al.* [145] zwei und sechs Wochen nach Nachlast-induzierter Myokardhypertrophie („Aortic Banding“) ebenso eine Erhöhung von GLB1, p16 und p53 und suggerierten genauso, dass Myofibroblasten der Hauptpopulation an seneszenten Zellen entsprechen. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass auch GLB1 einem zeitabhängigen Regulationsprozess unterliegt. Des Weiteren war die Proteinexpression von SIRT1, bekannt als positiver Regulator der Telomerlänge [64], in unseren Experimenten in den Infarktmäusen vier Wochen nach MI signifikant erhöht. Ein möglicher Stimulus hierfür könnte das vermehrte Vorkommen von p53 und Bax sein, welche von SIRT1 negativ reguliert werden [66, 146].

## 5.2. Extrakardiale Veränderungen auf molekularer Ebene

- **Telomerbiologie und zelluläre Seneszenz werden vier Wochen nach Myokardinfarkt organspezifisch reguliert.**

Bereits in verschiedenen Untersuchungen wurden vorteilhafte Effekte auf das kardiovaskuläre System durch Aktivierung der Telomerase im Gefäßsystem, mutmaßlich durch Protektion vor reaktiven Sauerstoffspezies durch TERT, festgestellt [147-149]. In unserem Schadensmodell war keine signifikante Regulation der Telomeraseaktivität, der Telomerlänge und der TRF2-Proteinexpression im Aortengewebe nach MI erkennbar, bei allerdings sehr heterogenen Messergebnissen, a.e. bedingt durch die geringe Menge und heterogene Zusammensetzung des Gewebes der Aorta ascendens.

Dahingegen zeigten die Experimente im Leberparenchym eine Reduktion der Telomeraseaktivität. Kürzlich entdeckten Wissenschaftler, dass nur eine bestimmte Gruppe an Hepatozyten Telomerase exprimiert, welche sowohl für die Homöostase als auch die Regeneration des Leberparenchyms verantwortlich sind [150]. Generell weiß man, dass eine Einschränkung der Leberleistung häufig mit Herzinsuffizienz assoziiert ist und mit schlechterem Outcome korreliert [151]. Es bleibt daher zu



diskutieren, ob die Telomerbiologie ein grundlegender Faktor in der Interaktion zwischen Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Leberfunktionsstörungen ist.

In unseren Analysen wiesen die aus den Milzen isolierten MNC eine deutliche Steigerung der Telomerlänge auf, gleichzeitig waren aber keine relevanten Veränderungen hinsichtlich der Aktivität der Telomerase und der TRF2-Proteinsynthese zu verzeichnen. In einer prospektiven Kohortenstudie wurde festgestellt, dass längere leukozytäre Telomere bei gesunden Studienteilnehmern über 65 Jahre mit einem höheren Risiko für einen MI assoziiert ist [117]. Haver *et al.* postulierten jedoch [118], dass nach stattgehabtem STEMI die Telomerlänge in Leukozyten keinen Effekt auf das kardiale Remodeling und die Funktion hat. Inwiefern daher eine Blutanalyse mit Messung der leukozytären Telomerlänge als Surrogatparameter vor oder nach MI eine Rolle spielt, bleibt eine Frage für zukünftige Studien. Wir gehen davon aus, dass die erhöhte MNC-Telomerlänge Ausdruck einer vermehrten Akkumulation von stammzellnahen Zellen mit längeren Telomeren ist, weil die Milz in der Maus ein blutbildendes Organ ist.

Dementsprechend scheinen nach MI selbst in herzfernem Gewebe Veränderungen auf molekularer Ebene stattzufinden, die die Telomere betreffen. Möglicherweise liegt dem eine kompensatorische Aktivierung v.a. hämatopoietischer Organe (Leber, Milz, Knochenmark) durch systemische Hypoxie, Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies, Chemokine und Zytokine zu Grunde. Die wäre ein wichtiges Thema für zukünftige Studien.

### **5.3. Kardiale und extrakardiale Veränderungen auf molekularer Ebene in TERT-Knockoutmäusen vier Wochen nach Myokardinfarkt**

- **Es zeigen sich genotypische Unterschiede hinsichtlich der kardialen und systemischen Telomerbiologie und Seneszenz nach Induktion eines Myokardinfarktes.**

Mauslinien mit Depletion entweder der Telomerase, der in ihr integrierten RNA-Matrize TERC oder ihrer katalytischen Untereinheit TERT sind hinsichtlich kardiovaskulärer Krankheitsmodelle bislang wenig charakterisiert [71, 152]. Theoretisch sollten

homozygote TERT-Knockoutmäuse keine Telomeraseaktivität vorweisen und könnten somit die Länge ihrer Telomere nicht aufrechterhalten [153]. Dies betrifft Mäuse ab der 4. - 5. Filialgeneration. In den in dieser Arbeit verwendeten TERT<sup>-/-</sup>-Mäusen handelte es sich bewusst um Tiere der 2. Tochtergeneration (siehe Methoden), daher war die kardiale Telomerlänge im Vergleich nicht signifikant verkürzt, ebenso in MNC. Auffälligerweise war im Myokard und in der Aortenwand der TERT<sup>-/-</sup>-Shammäuse eine vermehrte Expression von TRF2-Protein zu finden, eine signifikante zusätzliche Regulation in den Infarkttieren fand sich jedoch nicht. Weitere Analysen zeigten, dass TRF2-Protein in der Leber und in den MNC der TERT<sup>-/-</sup>-Infarktmäuse in signifikant geringeren Mengen vorlag und somit hier eine verminderte Telomerstabilisierung zu vermuten ist. Dies ist ein neuer Aspekt, bisher wurden die Lebern von TERT<sup>-/-</sup> vs. TERT<sup>+/+</sup>-Tieren nicht systematisch untersucht. Die Leber ist im Gegensatz zum Herz ein hochproliferatives Organ und daher evtl. besonders empfindlich für das Fehlen der aktiven Telomerase. Dazu passt, dass in den TERT<sup>+/+</sup> MI und TERT<sup>-/-</sup>-Tieren (sowohl Sham als auch MI) im Vgl. zu TERT<sup>+/+</sup>-Sham diskret kürzere Telomere vorlagen.

Im Vergleich zu scheinoperierten Tieren vom Stamm C57Bl/6N wies das ischämisch geschädigte Myokard der TERT-Knockoutmäuse eine signifikante Reduktion des Apoptoseinduktors p53 auf. Letztlich bestehen dabei Kontroversen, da beispielsweise Zhu *et al.* [129] in ihren *in vivo*-Versuchsreihen bei MI eine vermehrte Kollagenakkumulation bei p53-Defizienz nachweisen konnten und sie daher schlussfolgerten, dass eine Reduktion der Aktivität von p53 zu einer vermehrten reparativen Fibrose führe mit konsekutiver Prävention einer Herzruptur. Zudem können sich die Effekte von Bax nach MI bekanntlich nachteilig auf das Herz auswirken, da sich bei Bax-Knockoutmäusen eine Reduktion der Infarktgröße sowie eine Verbesserung der myokardialen Funktion zeigte [154]. Hier zeigte sich in unseren Versuchsreihen lediglich eine Tendenz zur Herunterregulation der Bax-Proteinexpression. Insgesamt scheint bei den TERT-Knockoutmäusen in der vorliegenden Arbeit der alternative apoptotische Signalweg über p16 aktiviert zu werden, da dieser Marker in unseren Versuchsreihen signifikant höhere Konzentrationen aufwies und die histologischen Untersuchungen eine vermehrte Infarktgröße, trotz geringerer Proteinexpression von Bax, zeigten.

Unterschiedliche Ergebnisse zeigten sich in Aortenwänden, im Leberparenchym und in MNC bei fehlender Regulation der p53-Proteinexpression, p16 hingegen war in den MNC der TERT<sup>-/-</sup>-Mäuse mit und ohne Infarkt geringer exprimiert. Gleichzeitig fand

sich eine signifikante Steigerung der p16-Proteinexpression in der Aorta der TERT<sup>-/-</sup>-Shammäuse. In der Leber zeigte sich eine Steigerung von SIRT1 als möglicher Regulationsweg der Seneszenz, da hier p16 nicht signifikant reguliert war. Generell scheinen daher auch genotypische Unterschiede hinsichtlich der extrakardialen Seneszenz nach MI zu bestehen, doch die Ergebnisse waren deutlich heterogener als im Myokard.

#### **5.4. Kardiale Veränderungen auf histologischer und funktioneller Ebene in TERT<sup>-/-</sup>- und TERT<sup>+/-</sup>-Mäusen**

- **Homozygote TERT-Knockoutmäuse weisen eine vermehrte Akkumulation von Fibrose in der IZ und keine Hypertrophie von Myozyten auf.**

Wir schließen aus unseren Ergebnissen, dass die Telomerase und telomer-assoziierte Proteine bedeutsam für die Narbenbildung und das myokardiale Zellüberleben nach Ischämie sind. Generell scheint TERT eine bedeutsame Rolle bei der Angiogenese in ischämischem Muskelgewebe zu spielen [155]. Da wir in unseren histologischen Analysen mit *Sirius Red* und molekularbiologischen Untersuchungen mit Collagen-1 $\alpha$  und CTGF eine deutlich vermehrte Akkumulation von Fibrose bzw. Fibrosemarkern in der IZ detektiert haben, wären Einschränkungen im Hinblick auf die Angiogenese durch das Fehlen von TERT daher ein denkbarer Grund. Zusätzliche Experimente mit weiteren molekularbiologischen Analysen, wie beispielsweise hinsichtlich einer Reduktion der Neoangiogenese bei TERT<sup>-/-</sup>-Mäusen nach akuter Myokardischämie, wären daher von Interesse. Der etablierte Fibrosemarker CTGF ist sowohl in Kardiomyozyten als auch in Fibroblasten exprimiert [156] und scheint auch in anderen Herzerkrankungen, wie bei Vorhofflimmern [157], eine wichtige Rolle einzunehmen. Entgegen unserer Beobachtung zeigte eine andere Arbeitsgruppe in transgenen Mäusen mit TERT-Defizienz eine Reduktion der Infarktgröße um etwa ein Viertel 24 Stunden nach permanenter proximaler LAD-Ligatur [137]. Eine rezentere Studie wies jedoch nach, dass eine vermehrte kardiale Expression von TERT mit einer Reduktion der Infarktgröße 6 Wochen nach induziertem Schaden einhergeht [136]. Diese Ergebnisse legen dementsprechend ebenfalls dar, dass die Regulation der Telomerbiologie nach Ischämie ein zeitlich dynamischer Prozess zu sein scheint.

Zur Bestimmung einer möglichen Herzhypertrophie wurden die Indices Herzgewicht / Tibiallänge bzw. / KG [158] berechnet, welche-hierfür keinen Anhalt vier Wochen nach MI in TERT<sup>-/-</sup>- und TERT<sup>+/+</sup>-Mäusen gaben. Oh *et al.* demonstrierten, dass bei einer Überexpression von TERT eine Hypertrophie der Kardiomyozyten zu beobachten war [137]. Des Weiteren lieferten Studien das Ergebnis, dass der Marker SIRT1 in erster Linie protektive Effekte auf das Herz hat [159, 160]. Zudem zeigten Experimente, wie beispielsweise von Planavila *et al.*, dass SIRT1 einer kardialen Hypertrophie entgegenwirkt [161]. Auch unsere Analysen brachten hervor, dass keine Myokardhypertrophie bei gleichzeitig vermehrter Expression von SIRT1 und verminderter Expression von TERT vorliegt. Demzufolge scheinen die beschriebenen Regulationsprozesse nicht mit einer Veränderung der Myozytengröße als Kompensationsmechanismus einherzugehen. Ob und inwiefern dies eine Rolle im längeren Zeitverlauf nach MI spielt, bleibt zu klären.

- **Eine Defizienz von TERT führt vier Wochen nach Myokardinfarkt nicht zu eindeutig unterschiedlichen Auswirkungen auf die Herzfunktion.**

Erwartungsgemäß fand sich in der Volumetrie der Kardio-MRT eine signifikante Einschränkung der linksventrikulären Pumpfunktion in den Infarktmäusen beider Genotypen. Ein direkter Vergleich zwischen beiden Infarktgruppen TERT<sup>-/-</sup> und TERT<sup>+/+</sup> mit etwaigen Unterschieden könnte jedoch artifiziell bedingt sein, da hier unterschiedliche Infarktgrößen je nach Tier bzw. Auswirkungen der für das MRT nötigen Isofluran-Narkose auf die Herzfunktion eine Rolle spielen könnten. In den zusätzlich durchgeführten invasiven Messungen lagen keine signifikanten Unterschiede der linksventrikulären Drücke zwischen den Genotypen vor. Mäuse mit MI und bestehender kardialer Expression von TERT scheinen aber generell eine bessere ventrikuläre Funktion und eine höhere Überlebensrate zu haben [136]. Eine Studie mit TERC-Knockoutmäusen und konsekutiv kritisch kurzen Telomeren unterstrich ebenfalls die Relevanz der RNA-Matrize der Telomerase, da diese Tiere früh eine Kardiomyopathie mit ventrikulärer Dilatation, Ausdünnung der Myokardwände und kardialer Dysfunktion entwickelten [134]. Daher sei hier nochmals betont, dass die in dieser Arbeit verwendeten TERT-Tiere keine verkürzten Telomere hatten. Insbesondere hinsichtlich funktioneller Veränderungen der Herzleistung und der Entwicklung einer ischämischen Kardiomyopathie durch progressive

Myokardfibrose wären Experimente zu noch späteren Zeitpunkten nach MI von großem Interesse und klinischer Relevanz

## 5.5. Zusammenfassung und Ausblick

Die durchgeführte Arbeit demonstriert erstmals, dass im infarzierten Mausherz eine zeitlich und regional dynamische Aktivierung der myokardialen Telomerase stattfindet. Dieser Prozess fand zuerst in der IZ und später dann auch in der RZ um das Infarktareal statt. Die detaillierte Charakterisierung dieser regulatorischen Effekte zeigte auf molekularer Ebene eine ähnliche Dynamik für telomer-stabilisierende Proteine, Seneszenzmarker, Apoptosemediatoren und Zellzyklusregulatoren. Zudem scheinen im Rahmen des Ischämie-induzierten kardialen Remodelings auch systemische Einflüsse auf Telomerparameter, Apoptose- / Zellzyklusregulatoren und Seneszenz vorzuliegen, da sich in unseren Analysen unterschiedliche Regulationsmuster im Leberparenchym und der Milz (gemessen in den MNC), beides hämatopoetische Organe in der Maus, nachweisen ließen. In der Aorta ascendens waren die Ergebnisse leider materialbedingt zu heterogen, um eine klare Aussage zu treffen.

Die Ergebnisse aus den Experimenten an TERT-Knockoutmäusen ergaben einen Zusammenhang zwischen der Defizienz von TERT und dem fehlenden Nachweis einer erhöhten myokardialen Telomerlänge in Kombination mit geringerer TRF2-Proteinexpression in der IZ im Myokard vier Wochen nach LAD-Ligatur. Diese Effekte scheinen im Einklang mit den weiteren beschriebenen Störungen der „normalen Infarktheilung“ mit einer vermehrten Akkumulation von Kollagen bzw. der Entwicklung einer gesteigerten regionalen Fibrose im Rahmen der Ausbildung der Infarkt Narbe einherzugehen; eine Hypertrophie des Myokards oder klinische Zeichen einer Herzinsuffizienz zeigten sich hingegen nicht. Die Infarktmäuse der Gruppen TERT<sup>+/+</sup> und TERT<sup>-/-</sup> zeigten im Kardio-MRT vergleichbare Einschränkungen der Pumpfunktion im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren; signifikante Veränderungen der mittels Millar-Katheter gemessenen linksventrikulären Drücke fanden sich zu dem Zeitpunkt 4 Wochen nach OP ebenfalls keine. Zu erwähnen sei hier allerdings, dass es durch die variable Größe der Herzinfarkte nach LAD-Ligatur in Folge unterschiedlicher Größe

des myokardialen Versorgungsgebiets bei Mäusen (noch ausgeprägter als beim Menschen) schwierig ist, wirkliche funktionelle Unterschiede zwischen den beiden Genotypen zu detektieren.

Aufgrund dieser Erkenntnisse vermuten wir, dass ein ischämischer Myokardschaden mit Apoptoseinduktion, Zellzyklusstopp und Einleitung einer prämaturnen Seneszenz in geschädigtem Myokard zu einer Aktivierung der Telomerase und telomerstabilisierender Proteine zum Schutz der DNA in umgebenden erhaltenen Zellen im Myokard führt. Die gesteigerte myokardiale Telomerlänge im Herzgewebehomogenat 4 Wochen nach der Ischämie könnte die Folge einer gesteigerten Proliferation residenter kardialer Stammzellen, welche sowohl zu Myozyten als auch zu Bindegewebszellen oder Gefäßzellen differenzieren können, sein. Ferner ist es wahrscheinlich, dass sowohl eingewanderte regenerative stammzellnahe Zellen aus den blutbildenden Organen (z.B. zirkulierende Fibrozyten) als auch in das Herz migrierte Inflammationszellen, die für die Infarktheilung von Bedeutung sind, diesen Effekt verursachen. Die Störung dieser Mechanismen bei globaler TERT-Defizienz könnte ein wichtiger neuer Mechanismus sein. Um diese Hypothese genauer zu untersuchen, wären weitere Studien mit genauerer Analyse der Effekte der unterschiedlichen Zellpopulationen im Myokardgewebe sinnvoll.

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit zeigen somit neue, möglicherweise kompensatorische Signalwege bei akutem Myokardschaden und könnten eine Grundlage für die zukünftige Entwicklung neuer therapeutischer Strategien darstellen. Über eine Beeinflussung der Zellalterung wäre es vielleicht möglich, die Entwicklung einer ischämischen Kardiomyopathie als gefürchtete Folgeerscheinung nach Herzinfarkt mit hoher Morbidität und Mortalität, welche unter anderem durch maladaptives Remodeling verursacht wird, günstig zu beeinflussen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. World Health Organization. *Global status report on noncommunicable diseases*. 2010 [cited 2018 19 March]; Available from: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789240686458\\_eng.pdf?ua=1](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789240686458_eng.pdf?ua=1).
2. National Institutes of Health. National Heart, L., and Blood Institute,. *Morbidity & Mortality: 2012 Chart book on cardiovascular, lung, and blood diseases*. 2012 [cited 2018 19 March]; Available from: [https://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/research/2012\\_ChartBook\\_508.pdf](https://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/research/2012_ChartBook_508.pdf).
3. Mathers, C.D. and D. Loncar, *Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030*. PLoS Med, 2006. **3**(11): p. e442.
4. Nichols, M., et al., *Trends in age-specific coronary heart disease mortality in the European Union over three decades: 1980-2009*. Eur Heart J, 2013. **34**(39): p. 3017-27.
5. Statistisches Bundesamt. *Todesursachen in Deutschland*. 2012 [cited 2018 19 March]; Available from: [https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400127004.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400127004.pdf?__blob=publicationFile).
6. Statistisches Bundesamt. *Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen die höchsten Kosten*. 2017 [cited 2018 19 March]; Available from: [https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2017/09/PD17\\_347\\_236pdf.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2017/09/PD17_347_236pdf.pdf?__blob=publicationFile).
7. Lakatta, E.G., *Age-associated cardiovascular changes in health: impact on cardiovascular disease in older persons*. Heart Fail Rev, 2002. **7**(1): p. 29-49.
8. Ezekowitz, J.A., et al., *Declining in-hospital mortality and increasing heart failure incidence in elderly patients with first myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(1): p. 13-20.
9. Neumann, T., et al., *Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives*. Dtsch Arztebl Int, 2009. **106**(16): p. 269-75.
10. Yusuf, S., et al., *Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization*. Circulation, 2001. **104**(22): p. 2746-53.
11. Muller, H.J., *The remaking of chromosomes*. The Collecting Net, 1938. **13**: p.181–198.
12. McClintock, B., *The stability of broken ends of chromosomes in Zea mays*. Genetics, 1941. **26**: p. 234–282.
13. Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider, *Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts*. Nature, 1990. **345**(6274): p. 458-60.
14. Allsopp, R.C., et al., *Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10114-8.
15. Hastie, N.D., et al., *Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing*. Nature, 1990. **346**(6287): p. 866-8.
16. Greider, C.W. and E.H. Blackburn, *Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts*. Cell, 1985. **43**(2 Pt 1): p. 405-13.
17. Zakian, V.A., *Telomeres: beginning to understand the end*. Science, 1995. **270**(5242): p. 1601-7.
18. Bouffler, S.D., *Involvement of telomeric sequences in chromosomal aberrations*. Mutat Res, 1998. **404**(1-2): p. 199-204.
19. Moyzis, R.K., et al., *A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(18): p. 6622-6.
20. Martens, U.M., et al., *Short telomeres on human chromosome 17p*. Nat Genet, 1998. **18**(1): p. 76-80.
21. Blasco, M.A., et al., *Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA*. Cell, 1997. **91**(1): p. 25-34.

22. Makarov, V.L., Y. Hirose, and J.P. Langmore, *Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening*. Cell, 1997. **88**(5): p. 657-66.
23. Chai, W., et al., *Human telomeres have different overhang sizes at leading versus lagging strands*. Mol Cell, 2006. **21**(3): p. 427-35.
24. Nikitina, T. and C.L. Woodcock, *Closed chromatin loops at the ends of chromosomes*. J Cell Biol, 2004. **166**(2): p. 161-5.
25. Greider, C.W., *Telomeres do D-loop-T-loop*. Cell, 1999. **97**(4): p. 419-22.
26. Paeschke, K., et al., *Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures in vivo*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(10): p. 847-54.
27. Ambrus, A., et al., *Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(9): p. 2723-35.
28. Broccoli, D., et al., *Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2*. Nat Genet, 1997. **17**(2): p. 231-5.
29. de Lange, T., *Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres*. Genes Dev, 2005. **19**(18): p. 2100-10.
30. Stansel, R.M., T. de Lange, and J.D. Griffith, *T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang*. EMBO J, 2001. **20**(19): p. 5532-40.
31. de Lange, T., *Protection of mammalian telomeres*. Oncogene, 2002. **21**(4): p. 532-40.
32. van Steensel, B., A. Smogorzewska, and T. de Lange, *TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions*. Cell, 1998. **92**(3): p. 401-13.
33. Griffith, J.D., et al., *Mammalian telomeres end in a large duplex loop*. Cell, 1999. **97**(4): p. 503-14.
34. Smogorzewska, A., et al., *Control of human telomere length by TRF1 and TRF2*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(5): p. 1659-68.
35. Zahler, A.M., et al., *Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures*. Nature, 1991. **350**(6320): p. 718-20.
36. Blackburn, E.H., *Telomere states and cell fates*. Nature, 2000. **408**(6808): p. 53-6.
37. Olovnikov, A.M., *A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon*. J Theor Biol, 1973. **41**(1): p. 181-90.
38. Watson, J.D., *Origin of concatemeric T7 DNA*. Nat New Biol, 1972. **239**(94): p. 197-201.
39. Levy, M.Z., et al., *Telomere end-replication problem and cell aging*. J Mol Biol, 1992. **225**(4): p. 951-60.
40. Hayflick, L., *The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains*. Exp Cell Res, 1965. **37**: p. 614-36.
41. Kim, N.W., et al., *Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer*. Science, 1994. **266**(5193): p. 2011-5.
42. Wright, W.E., et al., *Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells*. Dev Genet, 1996. **18**(2): p. 173-9.
43. Feng, J., et al., *The RNA component of human telomerase*. Science, 1995. **269**(5228): p. 1236-41.
44. Cohen, S.B., et al., *Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells*. Science, 2007. **315**(5820): p. 1850-3.
45. Zhu, J., et al., *Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3723-8.
46. Herrera, E., et al., *Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres*. EMBO J, 1999. **18**(11): p. 2950-60.
47. Calado, R.T. and N.S. Young, *Telomere diseases*. N Engl J Med, 2009. **361**(24): p. 2353-65.
48. O'Sullivan, R.J., et al., *Reduced histone biosynthesis and chromatin changes arising from a damage signal at telomeres*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(10): p. 1218-25.



49. Conomos, D., H.A. Pickett, and R.R. Reddel, *Alternative lengthening of telomeres: remodeling the telomere architecture*. *Front Oncol*, 2013. **3**: p. 27.
50. Beliveau, A. and P. Yaswen, *Soothing the watchman: telomerase reduces the p53-dependent cellular stress response*. *Cell Cycle*, 2007. **6**(11): p. 1284-7.
51. Haendeler, J., et al., *Antioxidants inhibit nuclear export of telomerase reverse transcriptase and delay replicative senescence of endothelial cells*. *Circ Res*, 2004. **94**(6): p. 768-75.
52. Ben-Porath, I. and R.A. Weinberg, *When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence*. *J Clin Invest*, 2004. **113**(1): p. 8-13.
53. Mao, Z., et al., *Replicatively senescent cells are arrested in G1 and G2 phases*. *Aging (Albany NY)*, 2012. **4**(6): p. 431-5.
54. Schmitt, C.A., *Senescence, apoptosis and therapy--cutting the lifelines of cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(4): p. 286-95.
55. Chen, Q.M., *Replicative senescence and oxidant-induced premature senescence. Beyond the control of cell cycle checkpoints*. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. **908**: p. 111-25.
56. Gire, V., et al., *DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence*. *EMBO J*, 2004. **23**(13): p. 2554-63.
57. Chehab, N.H., et al., *Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53*. *Genes Dev*, 2000. **14**(3): p. 278-88.
58. Buscemi, G., et al., *The shelterin protein TRF2 inhibits Chk2 activity at telomeres in the absence of DNA damage*. *Curr Biol*, 2009. **19**(10): p. 874-9.
59. Sionov, R.V. and Y. Haupt, *The cellular response to p53: the decision between life and death*. *Oncogene*, 1999. **18**(45): p. 6145-57.
60. Ferbeyre, G. and S.W. Lowe, *The price of tumour suppression? Nature*, 2002. **415**(6867): p. 26-7.
61. Ozaki, T. and A. Nakagawara, *Role of p53 in Cell Death and Human Cancers*. *Cancers (Basel)*, 2011. **3**(1): p. 994-1013.
62. Ozaki, T. and A. Nakagawara, *p53: the attractive tumor suppressor in the cancer research field*. *J Biomed Biotechnol*, 2011. **2011**: p. 603925.
63. Finkel, T., C.X. Deng, and R. Mostoslavsky, *Recent progress in the biology and physiology of sirtuins*. *Nature*, 2009. **460**(7255): p. 587-91.
64. Palacios, J.A., et al., *SIRT1 contributes to telomere maintenance and augments global homologous recombination*. *J Cell Biol*, 2010. **191**(7): p. 1299-313.
65. Jeong, S.M. and M.C. Haigis, *Sirtuins in Cancer: a Balancing Act between Genome Stability and Metabolism*. *Mol Cells*, 2015. **38**(9): p. 750-8.
66. Vaziri, H., et al., *hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase*. *Cell*, 2001. **107**(2): p. 149-59.
67. Ota, H., et al., *Sirt1 modulates premature senescence-like phenotype in human endothelial cells*. *J Mol Cell Cardiol*, 2007. **43**(5): p. 571-9.
68. Datta, S.R., A. Brunet, and M.E. Greenberg, *Cellular survival: a play in three Akts*. *Genes Dev*, 1999. **13**(22): p. 2905-27.
69. Li, T., et al., *Oligomeric BAX induces mitochondrial permeability transition and complete cytochrome c release without oxidative stress*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1777**(11): p. 1409-21.
70. Miyashita, T. and J.C. Reed, *Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene*. *Cell*, 1995. **80**(2): p. 293-9.
71. Wong, L.S., et al., *Telomere biology in cardiovascular disease: the TERC-/- mouse as a model for heart failure and ageing*. *Cardiovasc Res*, 2009. **81**(2): p. 244-52.
72. Chimenti, C., et al., *Senescence and death of primitive cells and myocytes lead to premature cardiac aging and heart failure*. *Circ Res*, 2003. **93**(7): p. 604-13.
73. Liu, Y., et al., *Expression of p16(INK4a) in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging*. *Aging Cell*, 2009. **8**(4): p. 439-48.
74. Serrano, M., G.J. Hannon, and D. Beach, *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4*. *Nature*, 1993. **366**(6456): p. 704-7.

75. Rayess, H., M.B. Wang, and E.S. Srivatsan, *Cellular senescence and tumor suppressor gene p16*. Int J Cancer, 2012. **130**(8): p. 1715-25.
76. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9363-7.
77. Hall, B.M., et al., *Aging of mice is associated with p16(Ink4a)- and beta-galactosidase-positive macrophage accumulation that can be induced in young mice by senescent cells*. Aging (Albany NY), 2016. **8**(7): p. 1294-315.
78. Kurz, D.J., et al., *Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells*. J Cell Sci, 2000. **113** ( Pt 20): p. 3613-22.
79. Pfeffer, M.A. and E. Braunwald, *Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications*. Circulation, 1990. **81**(4): p. 1161-72.
80. Rouleau, J.L., et al., *Activation of neurohumoral systems in postinfarction left ventricular dysfunction*. J Am Coll Cardiol, 1993. **22**(2): p. 390-8.
81. Opie, L.H., et al., *Controversies in ventricular remodeling*. Lancet, 2006. **367**(9507): p. 356-67.
82. Lip, G.Y., C.R. Gibbs, and D.G. Beevers, *ABC of heart failure: aetiology*. BMJ, 2000. **320**(7227): p. 104-7.
83. Levy, D., et al., *Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure*. N Engl J Med, 2002. **347**(18): p. 1397-402.
84. Vanhoutte, D., et al., *Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(3): p. 604-13.
85. Frangogiannis, N.G., C.W. Smith, and M.L. Entman, *The inflammatory response in myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(1): p. 31-47.
86. Creemers, E.E., et al., *Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure?* Circ Res, 2001. **89**(3): p. 201-10.
87. Whelan, R.S., V. Kaplinskiy, and R.N. Kitsis, *Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 19-44.
88. Shih, H., et al., *The aging heart and post-infarction left ventricular remodeling*. J Am Coll Cardiol, 2011. **57**(1): p. 9-17.
89. Anderson, K.R., M.G. Sutton, and J.T. Lie, *Histopathological types of cardiac fibrosis in myocardial disease*. J Pathol, 1979. **128**(2): p. 79-85.
90. Sutton, M.G. and N. Sharpe, *Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy*. Circulation, 2000. **101**(25): p. 2981-8.
91. Kellerman, S., et al., *Nuclear DNA content and nucleation patterns in rat cardiac myocytes from different models of cardiac hypertrophy*. J Mol Cell Cardiol, 1992. **24**(5): p. 497-505.
92. Beltrami, A.P., et al., *Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction*. N Engl J Med, 2001. **344**(23): p. 1750-7.
93. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 389-95.
94. Fuchs, S., et al., *Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia*. J Am Coll Cardiol, 2001. **37**(6): p. 1726-32.
95. Losordo, D.W. and S. Dimmeler, *Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies*. Circulation, 2004. **109**(22): p. 2692-7.
96. Asahara, T., et al., *VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells*. EMBO J, 1999. **18**(14): p. 3964-72.
97. Chavakis, E. and S. Dimmeler, *Homing of progenitor cells to ischemic tissues*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(4): p. 967-80.
98. Yoon, H.J., et al., *Progressive dilation of the left atrium and ventricle after acute myocardial infarction is associated with high mortality*. Korean Circ J, 2013. **43**(11): p. 731-8.
99. Squier, T.C., *Oxidative stress and protein aggregation during biological aging*. Exp Gerontol, 2001. **36**(9): p. 1539-50.

100. Martin, G.M. and C.A. Sprague, *Clonal senescence and atherosclerosis*. Lancet, 1972. **2**(7791): p. 1370-1.
101. Olivetti, G., et al., *Apoptosis in the failing human heart*. N Engl J Med, 1997. **336**(16): p. 1131-41.
102. Olivetti, G., et al., *Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy*. Circ Res, 1991. **68**(6): p. 1560-8.
103. Centurione, L., et al., *Age-related death-survival balance in myocardium: an immunohistochemical and biochemical study*. Mech Ageing Dev, 2002. **123**(4): p. 341-50.
104. Ozawa, T., *Mitochondrial DNA mutations and age*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **854**: p. 128-54.
105. Meschiari, C.A., et al., *The impact of aging on cardiac extracellular matrix*. Geroscience, 2017. **39**(1): p. 7-18.
106. Boyle, A.J., et al., *The effects of aging on apoptosis following myocardial infarction*. Cardiovasc Ther, 2013. **31**(6): p. e102-10.
107. Azhar, G., et al., *Influence of age on hypoxia/reoxygenation-induced DNA fragmentation and bcl-2, bcl-xl, bax and fas in the rat heart and brain*. Mech Ageing Dev, 1999. **112**(1): p. 5-25.
108. Rajawat, Y.S., Z. Hilioti, and I. Bossis, *Aging: central role for autophagy and the lysosomal degradative system*. Ageing Res Rev, 2009. **8**(3): p. 199-213.
109. Matthews, C., et al., *Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress*. Circ Res, 2006. **99**(2): p. 156-64.
110. O'Rourke, M.F. and J. Hashimoto, *Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective*. J Am Coll Cardiol, 2007. **50**(1): p. 1-13.
111. Fleg, J.L. and J. Strait, *Age-associated changes in cardiovascular structure and function: a fertile milieu for future disease*. Heart Fail Rev, 2012. **17**(4-5): p. 545-54.
112. Samani, N.J., et al., *Telomere shortening in atherosclerosis*. Lancet, 2001. **358**(9280): p. 472-3.
113. Fuster, J.J. and V. Andres, *Telomere biology and cardiovascular disease*. Circ Res, 2006. **99**(11): p. 1167-80.
114. van der Harst, P., et al., *Telomere length of circulating leukocytes is decreased in patients with chronic heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(13): p. 1459-64.
115. Vasan, R.S., et al., *Association of leukocyte telomere length with circulating biomarkers of the renin-angiotensin-aldosterone system: the Framingham Heart Study*. Circulation, 2008. **117**(9): p. 1138-44.
116. Tsirpanlis, G., et al., *Serum oxidized low-density lipoprotein is inversely correlated to telomerase activity in peripheral blood mononuclear cells of haemodialysis patients*. Nephrology (Carlton), 2006. **11**(6): p. 506-9.
117. Osthus, I.B.O., et al., *Association of Telomere Length With Myocardial Infarction: A Prospective Cohort From the Population Based HUNT 2 Study*. Prog Cardiovasc Dis, 2017. **59**(6): p. 649-655.
118. Haver, V.G., et al., *Leukocyte telomere length and left ventricular function after acute ST-elevation myocardial infarction: data from the glycometabolic intervention as adjunct to primary coronary intervention in ST elevation myocardial infarction (GIPS-III) trial*. Clin Res Cardiol, 2015. **104**(10): p. 812-21.
119. Richardson, G.D., et al., *Telomerase expression in the mammalian heart*. FASEB J, 2012. **26**(12): p. 4832-40.
120. Kissel, C.K., et al., *Selective functional exhaustion of hematopoietic progenitor cells in the bone marrow of patients with postinfarction heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(24): p. 2341-9.
121. Small, E.M. and E.N. Olson, *Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 336-42.
122. Dimmeler, S. and P. Nicotera, *MicroRNAs in age-related diseases*. EMBO Mol Med, 2013. **5**(2): p. 180-90.
123. Boon, R.A., et al., *MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function*. Nature, 2013. **495**(7439): p. 107-10.

124. Ornish, D., et al., *Increased telomerase activity and comprehensive lifestyle changes: a pilot study*. *Lancet Oncol*, 2008. **9**(11): p. 1048-57.
125. Brouillette, S.W., et al., *Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study*. *Lancet*, 2007. **369**(9556): p. 107-14.
126. Strazhesko, I.D., et al., *Atorvastatin Therapy Modulates Telomerase Activity in Patients Free of Atherosclerotic Cardiovascular Diseases*. *Front Pharmacol*, 2016. **7**: p. 347.
127. Werner, C., et al., *Physical exercise prevents cellular senescence in circulating leukocytes and in the vessel wall*. *Circulation*, 2009. **120**(24): p. 2438-47.
128. Wilson, W.R., et al., *Blood leucocyte telomere DNA content predicts vascular telomere DNA content in humans with and without vascular disease*. *Eur Heart J*, 2008. **29**(21): p. 2689-94.
129. Zhu, F., et al., *Senescent cardiac fibroblast is critical for cardiac fibrosis after myocardial infarction*. *PLoS One*, 2013. **8**(9): p. e74535.
130. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J Biol Chem*, 1951. **193**(1): p. 265-75.
131. Cawthon, R.M., *Telomere measurement by quantitative PCR*. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(10): p. e47.
132. Kazakov, A., et al., *Raf kinase inhibitor protein mediates myocardial fibrosis under conditions of enhanced myocardial oxidative stress*. *Basic Res Cardiol*, 2018. **113**(6): p. 42.
133. Serrano, A.L. and V. Andres, *Telomeres and cardiovascular disease: does size matter?* *Circ Res*, 2004. **94**(5): p. 575-84.
134. Leri, A., et al., *Ablation of telomerase and telomere loss leads to cardiac dilatation and heart failure associated with p53 upregulation*. *EMBO J*, 2003. **22**(1): p. 131-9.
135. De Meyer, T., et al., *Telomere length and cardiovascular aging: the means to the ends?* *Ageing Res Rev*, 2011. **10**(2): p. 297-303.
136. Bar, C., et al., *Telomerase expression confers cardioprotection in the adult mouse heart after acute myocardial infarction*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 5863.
137. Oh, H., et al., *Telomerase reverse transcriptase promotes cardiac muscle cell proliferation, hypertrophy, and survival*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(18): p. 10308-13.
138. Oh, H., et al., *Telomere attrition and Chk2 activation in human heart failure*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(9): p. 5378-83.
139. Nahrendorf, M., M.J. Pittet, and F.K. Swirski, *Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction*. *Circulation*, 2010. **121**(22): p. 2437-45.
140. Swirski, F.K. and M. Nahrendorf, *Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure*. *Science*, 2013. **339**(6116): p. 161-6.
141. Minamino, T., S.A. Mitsialis, and S. Kourembanas, *Hypoxia extends the life span of vascular smooth muscle cells through telomerase activation*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(10): p. 3336-42.
142. Li, S.H., et al., *Exogenous hTERT gene transfected endothelial progenitor cells from bone marrow promoted angiogenesis in ischemic myocardium of rats*. *Int J Clin Exp Med*, 2015. **8**(8): p. 14447-53.
143. Shieh, S.Y., et al., *The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites*. *Genes Dev*, 2000. **14**(3): p. 289-300.
144. Qian, Y. and X. Chen, *Senescence regulation by the p53 protein family*. *Methods Mol Biol*, 2013. **965**: p. 37-61.
145. Meyer, K., et al., *Essential Role for Premature Senescence of Myofibroblasts in Myocardial Fibrosis*. *J Am Coll Cardiol*, 2016. **67**(17): p. 2018-28.
146. Hsu, C.P., et al., *Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion*. *Circulation*, 2010. **122**(21): p. 2170-82.
147. Ait-Aissa, K., et al., *Friend or foe? Telomerase as a pharmacological target in cancer and cardiovascular disease*. *Pharmacol Res*, 2016. **111**: p. 422-433.
148. Ait-Aissa, K., et al., *Telomerase reverse transcriptase protects against Angiotensin II induced microvascular endothelial dysfunction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017.

149. Beyer, A.M., et al., *Critical Role for Telomerase in the Mechanism of Flow-Mediated Dilation in the Human Microcirculation*. *Circ Res*, 2016. **118**(5): p. 856-66.
150. Lin, S., et al., *Distributed hepatocytes expressing telomerase repopulate the liver in homeostasis and injury*. *Nature*, 2018. **556**(7700): p. 244-248.
151. Maleki, M., F. Vakilian, and A. Amin, *Liver diseases in heart failure*. *Heart Asia*, 2011. **3**(1): p. 143-9.
152. Cheong, C., K.U. Hong, and H.W. Lee, *Mouse models for telomere and telomerase biology*. *Exp Mol Med*, 2003. **35**(3): p. 141-53.
153. Chiang, Y.J., et al., *Expression of telomerase RNA template, but not telomerase reverse transcriptase, is limiting for telomere length maintenance in vivo*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(16): p. 7024-31.
154. Hochhauser, E., et al., *Bax deficiency reduces infarct size and improves long-term function after myocardial infarction*. *Cell Biochem Biophys*, 2007. **47**(1): p. 11-20.
155. Zaccagnini, G., et al., *Telomerase mediates vascular endothelial growth factor-dependent responsiveness in a rat model of hind limb ischemia*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(15): p. 14790-8.
156. Koitabashi, N., et al., *Increased connective tissue growth factor relative to brain natriuretic peptide as a determinant of myocardial fibrosis*. *Hypertension*, 2007. **49**(5): p. 1120-7.
157. Adam, O., et al., *Rac1-induced connective tissue growth factor regulates connexin 43 and N-cadherin expression in atrial fibrillation*. *J Am Coll Cardiol*, 2010. **55**(5): p. 469-80.
158. Yin, F.C., et al., *Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat*. *Am J Physiol*, 1982. **243**(6): p. H941-7.
159. Matsushima, S. and J. Sadoshima, *The role of sirtuins in cardiac disease*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015. **309**(9): p. H1375-89.
160. Kovacic, J.C., et al., *Cellular senescence, vascular disease, and aging: Part 1 of a 2-part review*. *Circulation*, 2011. **123**(15): p. 1650-60.
161. Planavila, A., et al., *Sirt1 acts in association with PPARalpha to protect the heart from hypertrophy, metabolic dysregulation, and inflammation*. *Cardiovasc Res*, 2011. **90**(2): p. 276-84.

## 7. Publikationen / Dank

### 7.1. Publikationen

#### Kongressveröffentlichungen:

Werner C, **Arendt C**, Bakogiannis C, Müller A, Böhm M, Laufs U (2012) Dynamic regulation of myocardial telomere biology in the infarcted mouse heart. European Heart Journal 33 (Suppl), P785.

Werner C, **Arendt C**, Bakogiannis C, Schirmer SH, Müller A, Böhm M, Laufs U (2012) Myocardial Ischemia Induces Telomerase Activity in the Mouse Heart. Circulation 2012;125:18300.

Werner C, **Arendt C**, Bakogiannis C, Schirmer SH, Puhl SL, Müller A, Böhm M, Laufs U (2013) Dynamische Regulation der kardialen Telomeraseaktivität nach Myokardinfarkt. Clin Res Cardiol, 102, Suppl 1, P434.

#### Hauptpublikation:

In Vorbereitung.

### 7.2. Dank

Mein Dank richtet sich an all diejenigen, die mir mit Tatkraft und Unterstützung bei der vorliegenden Dissertation zur Seite standen. Zunächst möchte ich mich herzlichst bei meinem Betreuer und späteren Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. Christian Werner, für die Ausgestaltung und die vielen hervorragenden Ideen zu meiner Doktorarbeit danken. Insbesondere das entgegengebrachte Vertrauen und die kompetente Beratung bei allen Schwierigkeiten haben mich stets vorangetrieben und die Arbeit zu dem gemacht, was sie schlussendlich geworden ist. Vielen Dank für die investierte Zeit und die fortwährend großartige Unterstützung. Hervorheben möchte ich zudem Herrn Prof. Dr. Ulrich Laufs, der mich bis zu seiner Berufung nach Leipzig als Doktorvater betreut hat, für die Aufnahme in diese exzellente Arbeitsgruppe und die unermüdliche Unterstützung der Forschungsarbeiten. Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof.

---

Dr. Michael Böhm, dem Direktor der Kardiologie, Angiologie und Internistische Intensivmedizin am Universitätsklinikum des Saarlandes, insbesondere für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Gerätschaften des Labors, ohne diese die Verwirklichung der vorliegenden Dissertation nicht möglich gewesen wäre. Aufrichtiger Dank gebührt den medizinisch-technischen Laborassistentinnen der Arbeitsgruppe, Frau Ellen Becker und Jennifer Kieffer, welche mir stets mit Rat und Tat hinsichtlich experimenteller Vorgehensweisen, insbesondere bei der Durchführung der Operationen und der Organentnahmen, zur Seite standen. Dies war letztlich unabdingbar für die Vollendung dieser Arbeit. Vielen Dank auch an das Homburger Forschungsprogramm und die Coronastiftung für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes. Für die mentale Unterstützung in der Zeit der Fertigstellung danke ich von Herzen meinem Ehemann Benjamin Näßler. Ohne seine Kraft und Geduld hätte ich es nicht schaffen können, die Dissertation in dieser Form zu beenden. Nicht zuletzt möchte ich mich herzlich bei meiner Familie, meinen Freunden und den mir nahestehenden Kommilitonen bedanken, welche mich stets unterstützt und motiviert haben. Insbesondere wurde mir durch den Rückhalt meiner Mutter Sylvie Arendt die Durchführung des Medizinstudiums erst möglich gemacht.