
Aus der Abteilung Kardiologie und Angiologie der Medizinischen
Hochschule Hannover

**GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR 15,
EIN NEUARTIGES ZYTKIN DER TGF-BETA FAMILIE SCHÜTZT,
KARDIOMYOZYTEN VOR ISCHÄMIE-REPERFUSIONS-ASSOZIIERTEM
ZELLSCHADEN IN VITRO UND IN VIVO**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin in der Medizinischen Hochschule
Hannover

vorgelegt von Matthias Eden
aus Esens im Landkreis Wittmund
Hannover 2007

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover
Am 12.03.2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident Prof. Dr. med. Dieter Bitter-Suermann

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. med. Kai Christoph Wollert

Referent: Prof. Dr. med. Faikah Güler

Korreferent: PD Dr. rer. nat. Ulrich Maus

Tag der mündlichen Prüfung: 12.03.2008

Promotionsausschussmitglieder:

Prof. Dr. Tobias Welte

Prof. Dr. Carlos Guzmán

PD Dr. Frank Gossé

Danksagung:

Für meine Eltern, ohne deren Unterstützung und Erziehung diese Arbeit niemals möglich gewesen wäre.

Als nächstes möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kai C. Wollert für die Überlassung des Themas und die stets konstruktive Unterstützung ausdrücklich bedanken. Insbesondere gilt mein Dank Dr. Tibor Kempf für seine sympathische und lehrreiche Art mich in die Thematik und Methodik der Molekularen Kardiologie einzuarbeiten. Und natürlich möchte ich Prof. Dr. Kai C. Wollert selbst danken, der durch seine Betreuung und unverzichtbaren Input die Qualität dieser Arbeit stets verbessert hat.

Liste der häufig benutzten Abkürzungen

AaR	Area at risk (durch Ischämie gefährdetes aber eventuell durch Reperfusion gerettetes Herzareal)
bp	Basenpaare
ATP	Adenosintriphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
(m)RNS	(Messenger) Ribonukleinsäure
GDF-15	<i>Growth differentiation factor-15</i>
h	Stunde(n)
H ₂ O _{dd}	destilliertes Wasser
HE	Hämatoxylin/Eosin (histologische Färbung)
I/R	Ischämie/Reperfusion
kbp	Kilobasenpaare
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	<i>Knockout</i>
min	Minute(n)
rpm	rounds per minute
vs.	versus (gegenüber)
Sec	Sekunde(n)
TGFβ	<i>Transforming growth factor beta</i>
ü/N	über Nacht (Inkubation)
WT	Wildtyp

1	Einleitung	9
1.1	Koronare Herzkrankheit	9
1.2	Der Myokardinfarkt	10
1.3	Die myokardiale Ischämie/Reperfusion	12
1.4	Mechanismen des Ischämie-Reperfusionsschadens auf zellulärer Ebene	12
1.5	Der Zelltod (Apoptose vs. Nekrose)	14
1.5.1	Apoptose oder programmierter Zelltod	14
1.5.2	<i>BCL</i> -Familie und Apoptose-Regulation in der Ischämie-Reperfusion	15
1.5.3	Die <i>Mitochondriale Permeability-Transition</i> : Effektor im programmierten und unkontrollierten Zelltod	16
1.6	Adaptive Mechanismen des ischämischen Myokards	19
1.6.1	Das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung und Postkonditionierung	19
1.7	PI3Kinase-AKT-Bad-Zellüberlebenspfad	20
1.8	<i>GDF-15</i> ist eine neues divergentes Mitglied der <i>TGFβ</i> Familie	22
2	Problemstellung der Arbeit	25
3	Material und Methoden	26
3.1	Verwendete Geräte	26
3.2	Isolation und Kultivierung neonataler ventrikulärer Kardiomyozyten aus Sprague-Dawley-Ratten	27
3.2.1	Lösungen	27
3.2.2	Vorgehensweise	28
3.2.3	Stimulation der kultivierten Kardiomyozyten mit verschiedenen Agenzien	29
3.3	Simulation von Ischämie-Reperfusion <i>im in vitro</i> –Modell	30
3.3.1	Medien und Reagenzien	30
3.3.2	Hintergrund	30
3.3.3	Vorgehensweise	30
3.3.4	Stimulation der kultivierten Kardiomyozyten während simulierter Ischämie-Reperfusion	31
3.3.5	Schematischer Versuchsaufbau	32
3.4	Gewinnung von Zellproteinen aus <i>in vitro</i> Versuchen	32
3.4.1	Puffer und Reagenzien	32
3.4.2	Probeentnahme	33
3.4.3	Proteinbestimmung nach Bradford	33
3.5	Western-Blotting	34
3.5.1	Material und Reagenzien	34
3.5.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	35
3.5.2.1	Hintergrund	35
3.5.2.2	Vorgehen	35
3.5.3	Giessen und Beladen der Gele	36
3.5.4	Der Proteintransfer	36
3.5.4.1	Hintergrund	36
3.5.4.2	Vorgehen	37
3.5.4.3	Ponceau S Färbung	37
3.5.5	Immunoblotting	37
3.5.5.1	Lösungen	37
3.5.5.2	Vorgehen	38

3.6	Evaluation des Zelltodes	39
3.6.1	Nekrotischer Zelltod	39
3.6.1.1	Testprinzip	39
3.6.1.2	Material/Reagenzien	39
3.6.1.3	Vorgehen	40
3.6.2	Apoptotischer Zelltod: Messung von Apoptose assoziierten Oligonukleosomen mit einem Cell death Detection-ELISA plus	40
3.6.2.1	Hintergründe	40
3.6.2.2	Testprinzip	40
3.6.2.3	Material/Reagenzien	41
3.6.2.4	Vorgehen	41
3.6.3	Messung apoptotischer Kerne mittels TUNEL <i>in situ</i> Färbung	41
3.6.3.1	Hintergrund	41
3.6.3.2	Material/Reagenzien	42
3.6.3.3	Vorgehen	42
3.6.4	Messung der Phosphatidylserin-Exposition an der Außenseite der Zellmembran durch ANNEXIN V-Labeling und FACS Analyse	43
3.6.4.1	Hintergrund	43
3.6.4.2	Testprinzip	44
3.6.4.3	Material/Reagenzien	45
3.6.4.4	Trypsinisierung	45
3.6.4.5	Annexin V Labeling	45
3.7	Versuche zur GDF-15 Expression in vivo in der Maus	46
3.7.1	Chron. Infarktmodell und Ischämie / Reperfusionsmodell	46
3.7.2	Gewebeentnahme	47
3.7.3	Evans-Blue/TTC-Färbung zur Bestimmung der Infarktgröße	48
3.7.4	Entwässerung und Paraffinisierung Formalin fixierter Gewebe	49
3.7.4.1	Material	49
3.7.4.2	Durchführung	49
3.7.4.3	Vorbereitungen von OCT-Gefrierschnitten	50
3.7.5	HE-Färbung von Herzgefrierschnitten	50
3.8	TUNEL-Färbung von Paraffinschnitten zum Nachweis von Apoptose	51
3.8.1	Material	51
3.8.2	Durchführung	51
3.9	Isolation von gesamt RNA aus Myokardgewebe	53
3.9.1	Hintergrund/Prinzip	53
3.9.2	Geräte/Materialien/Reagenzien	53
3.9.3	Vorgehen	53
3.9.4	Spektralphotometrische Quantifizierung von RNA	54
3.10	Reverse Transkription der RNA	54
3.10.1	Hintergrund/Prinzip	54
3.10.2	Material/Reagenzien	55
3.10.3	Vorgehen	55
3.11	Real-time quantitative PCR	55
3.11.1	Hintergrund/Prinzip	55
3.11.2	Primer zur Durchführung der Real-time quantitativen PCR	56
3.11.3	GDF-15 Primer	57
3.11.4	Standardkurven	57
3.11.5	Schmelzkurvenanalyse	58
3.11.6	Normalisierung gegenüber „Housekeeping-Genen“ der Real-time quantitativen PCR	58

3.11.7	Material/Reagenzien	58
3.11.8	Vorgehen	59
3.11.9	Temperatursetup	59
3.12	Immunhistochemie	59
3.12.1	Hintergrund/Prinzip	59
3.12.2	Materialien/Reagenzien/Geräte	60
3.12.3	Vorgehen	61
3.13	Gewinnung von Gesamtzellprotein aus Geweben	62
3.13.1	Reagenzien/Material	62
3.13.2	Vorgehen	62
3.14	Statistische Auswertung	62
4	Ergebnisse	63
4.1	Stickstoffmonoxid (NO) reguliert die Expression von GDF-15	63
4.2	Simulierte Ischämie / Reperfusion induziert die Expression von GDF-15	65
4.2.1	<i>In Vitro</i> Versuche unter simulierter Ischämie-Reperfusion	65
4.3	Regulation der ischämie-induzierten GDF-15 Expression	66
4.4	GDF-15 mRNA Expression in murinem Myokard <i>in vivo</i> nach chronischem Myokardinfarkt und Ischämie-Reperfusion	67
4.4.1	Etablierung einer quantitativen, GDF-15-spezifischen Real-time PCR	67
4.4.2	GDF-15 mRNA Expression nach Induktion eines experimentellen chronischen Myokardinfarkts und nach Ischämie-Reperfusion im Mausmodell	69
4.4.3	Proteinexpression nach chronischer Ligatur der Koronararterie und Ischämie-Reperfusion	72
4.4.4	Immunhistologische Lokalisation von GDF-15 im ischämisch-reperfundierten Herzen	73
4.4.5	GDF-15 Proteinexpression in humanen Myokardgewebe	75
4.4.5.1	Immunhistochemische Untersuchungen an humanem Myokardgewebe post Myokardinfarkt.	77
4.5	Protektive Effekte von GDF-15 auf Kardiomyozyten bei simulierter Ischämie-Reperfusion	78
4.5.1	GDF-15 unterdrückt den nekrotischen Zellschaden während myokardialer Ischämie <i>in vitro</i>	78
4.5.2	GDF-15 vermindert den apoptotischen Zelltod in der Reperfusion	79
4.5.2.1	Messung apoptotischer Kardiomyozyten im Cell death detection Assay	80
4.5.2.2	Messung apoptotischer Kardiomyozyten in der TUNEL Färbung	81
4.5.2.3	Messung apoptotischer Zellen in der Annexin V FACS Analyse	82
4.6	Bedeutung der protektiven Wirkung von endogenem GDF-15 <i>in vivo</i>	84
4.6.1	Physiologischer Phänotyp der GDF-15 Knockout Maus	84
4.6.2	Infarktgrößenbestimmung	84
4.6.3	TUNEL-Assay zum Nachweis von Apoptose	85
4.7	Autokrine und parakrine Effekte von GDF-15 und Mechanismus der protektiven Wirkung bei Ischämie Reperfusion	86
4.7.1	GDF-15 aktiviert die Proteinkinase AKT	86
4.7.2	Die anti-apoptotische Wirkung von GDF-15 ist unter anderem durch BAD vermittelt	87
4.7.3	Humanes GDF-15 aktiviert parakrin den PI3Kinase Signaltransduktionsweg in Endothelzellen	89

5	Diskussion	90
5.1	GDF-15 als neuartiges Mitglied der Transforming-Growth-factor beta Familie und Signaltransduktion	91
5.2	Die gesteigerte GDF-15 Expression ist eine Antwort des Kardiomyozyten auf zellulären Stress <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	95
5.3	<i>Regelkreise und Mechanismen der GDF-15 Induktion</i>	96
5.4	Nach Ischämie und Ischämie-Reperfusion <i>in vivo</i> bilden Kardiomyozyten vermehrt GDF-15	98
5.5	GDF-15 ist im humanen Infarktgewebe vermehrt exprimiert	100
5.6	Zytoprotektive Eigenschaften von GDF-15 in der myokardialen Ischämie Reperfusion. <i>In vitro</i> Ergebnisse	101
5.7	GDF-15 Knock-out Modell GDF-15 Stimulation schützt Kardiomyozyten vor den Auswirkungen der Ischämie-Reperfusion	
5.8	Mechanismen der zytoprotektiven Wirkung von GDF-15 auf Kardiomyozyten während der Ischämie Reperfusion	103
5.9	Aussicht: Parakrine Effekte von GDF-15 in Myokardialen Gewebe	105
6	Zusammenfassung	108
7	Quellennachweise	109

1. Einleitung

1.1 Koronare Herzkrankheit

Unter dem Oberbegriff Koronare Herzkrankheit (KHK) sind alle stenosierenden Erkrankungen der Koronargefäße zusammengefasst, die zu myokardialer Ischämie führen können. Die koronare Herzkrankheit stellt die epidemiologisch bedeutendste erworbene Herzerkrankung dar. Ihre Folgen, der akute Herzinfarkt, der plötzliche Herztod, die ischämische Herzkrankheit und myokardiales Pumpversagen, sind die mit Abstand häufigsten krankheitsbedingten Todesursachen in der westlichen Welt.

Während etwa 25 % der akuten Myokardinfarkte letal enden, meist noch bevor die Patienten das Krankenhaus erreichen können, liegt auch die jährliche Sterblichkeit der KHK, abhängig von der Lokalisation und dem Schweregrad der zugrunde liegenden Gefäßeinengung bei 5-8% (bei einer kritischen Hauptstammstenose gar bei 30%) (Braunwald, Fauci, Kasper, Hauser, Longo, Jameson: Harrison's Principles of Internal Medicine 15th Edition 2001; McGraw Hill).

2003 entfielen in Deutschland etwa 46% aller Todesfälle auf Erkrankungen des Herzkreislaufsystems, etwa 65.000 davon erlitten einen akuten Myokardinfarkt. (Statistisches Bundesamt). Während etwa 280.000 Menschen in Deutschland jährlich einen Herzinfarkt erleiden, ist die genaue Prävalenz der Koronaren Herzerkrankung per se in Deutschland nicht genau bekannt, Schätzungen belaufen sich zwischen 3,5 und 5 Millionen.

So ist es nicht erstaunlich, dass größte Anstrengungen unternommen werden, um über die Prävention und Risikoreduktion, verbesserte Diagnostik und optimierte medikamentöse und apparative Therapie die Inzidenz und Prognose dieser Erkrankung zu verbessern. So wurden in den USA im Jahre 2002 etwa 1,2 Millionen Angioplastien vorgenommen, etwa 500.000 Bypass Operationen und 1,5 Millionen diagnostische Katheteruntersuchungen. Die perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA), die das Ziel verfolgt, schnellstmöglich die Minderperfusion durch Rekanalisierung zu beseitigen, stellt seit einigen Jahren, die Behandlungsmethode der Wahl dar. Hier wird durch Aufdehnung des verschlossenen Gefäßes mittels eines Ballonkatheters und gegebenenfalls der „Schienung“ dieses Gefäßes mittels eines Stents (Gefäßstütze) der Blutfluss wiederhergestellt. Doch trotz modernster Diagnostik und pharmakologischer, wie apparativer Therapeutik, bleiben die Fakten jedoch ernüchternd. Denn nicht nur

typische und spätere Komplikationen der PTCA, wie Restenose und Reinfarkt, sondern auch die akute Reperfusion selbst können das Herz weiter schädigen und damit die Prognose des Patienten verschlechtern.

1.2 Der Myokardinfarkt

Das Herz wird arteriell durch drei Koronararterien versorgt, die rechte Koronararterie (RCA) und die linke Koronararterie (LCA), deren Hauptstamm sich in den Ramus interventricularis anterior (RIVA, auch linke anterior deszendierende Arterie: LAD) und den Ramus circumflexus (RCX) aufteilt. Anhaltende Minderversorgung des Myokards durch Minder- oder fehlende Durchblutung eines oder mehrerer dieser Gefäße bewirken einen Myokardinfarkt. Die Ausprägung ist abhängig von der Größe des Versorgungsgebiets des Infarktgefäßes und der Dauer der Ischämie. In leichter Form begrenzt sich der Schaden subendokardial, in schwerer Form ist die Ausdehnung des ischämischen Bezirks transmural. Folgen sind eine myokardiale Nekrose und ein nachfolgender Gewebeverlust durch weiteren Zelluntergang und Vernarbung. Letztendlich führt dies zu einem Verlust und Umbau der Herzmuskulatur, gefolgt von einer Abnahme der Kontraktionsfähigkeit des Myokards bis zum klinischen Bild einer Herzinsuffizienz. Ursachen dieser *ischämischen Kardiomyopathie* und der Herzinsuffizienz sind vor allem prolongierte und rezidivierende Myokardinfarkte und dieses pathologische *Remodelling* des Myokards.

Unter einem Myokardinfarkt versteht man eine Koagulationsnekrose myokardialen Gewebes, die durch eine persistierende Ischämie bei plötzlicher, absoluter Koronarinsuffizienz auftritt. Die Myokardperfusion ist derart reduziert, dass die Herzmuskelzellen ihren überlebenswichtigen Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen zur Energiegewinnung nicht mehr decken können. Hält dieser Zustand über einen längeren Zeitraum an (30 min bis 2 h), führt dies zu einem irreversiblen Verlust von Myozyten durch nekrotischen Zelltod[1, 2].

Der Übergang einer stabilen koronaren Herzerkrankung in einen akuten Herzinfarkt ist meist auf eine spontane Alteration der Plaque-Morphologie, bei bestehender Koronarsklerose, zurückzuführen. Dabei ist das auslösende Ereignis die Zerreißung des stenosierenden Plaques, durch Einblutung in den Plaque, mit nachfolgender Volumenzunahme und Plaqueruptur, sowie einem Einriss mit Freilegung von

gerinnungsaktiven Plaquesubstanzen. Oder es kommt zu einer Ulzeration und Erosion der Plaques mit Freilegung von thrombogenen, subendothelialen Anteilen. Durch dieses Akutereignis sind Kompensationsmechanismen, wie Kollateralisierung über neu gebildete Gefäße, nicht adäquat in der Lage, eine ausreichende Versorgung des Gewebes sicherzustellen, es kommt auch hier zu einer ischämisch-bedingten myokardialen Dysfunktion[3].

Erste irreversible Veränderungen sind in den Kardiomyozyten bereits nach etwa 10 Minuten in der Elektronenmikroskopie sichtbar. Es kommt zur Erhöhung der zellulären Membranpermeabilität und als unmittelbare Folge zum Anschwellen der Zelle und deren Organellen (Onkose). Die Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum der Kardiomyozyten sind ödematös und zeigen eine Fragmentierung der Cristae. Gekoppelt an den Verlust der Membranintegrität ist die intrazelluläre Freisetzung lysosomaler Enzyme, die den zellulären Desintegrationsprozess weiter fördern (Autophagie)[4].

Das Zellkernchromatin ist deutlich marginalisiert, nach etwa 2 Std. werden größere Defekte in der Zellmembran sichtbar. Ab diesem Zeitpunkt können Makromoleküle wie herzspezifische Enzyme oder andere Proteine im Serum nachgewiesen werden. Endresultat ist das Zerreißen der Membranen und der unkoordinierten Zerstörung der Proteine und Nukleinsäuren. Durch diesen nekrotischen Zelltod der Kardiomyozyten werden inflammatorische Mediatoren freigesetzt und aktiviert, wodurch sie etwa nach 12 Std. Entzündungszellen aus dem Gefäßbett in das Infarktareal anlocken. Bei diesen Entzündungszellen handelt es sich zunächst vor allem um polymorphkernige Leukozyten[5]. Ab dem 3. Tag entwickelt sich Granulationsgewebe, welches neben Granulozyten zusätzlich aus Lymphozyten und Makrophagen, welche die nekrotischen Zellen abräumen, sowie aus Kapillaren und lockerem Bindegewebe besteht. Ab der 2. Woche nimmt die Vaskularisierung zugunsten der Narbenbildung durch Fibroblasten ab. Nach etwa 6 Wochen ist hierdurch das Infarktareal maßgeblich durch kollagenes, nicht-kontraktilen Bindegewebe ersetzt, dies wird auch als *pathologisches Remodelling* bezeichnet[2, 5-7].

Die Größe des Infarkts und der resultierende Ausfall an kontraktilen Gewebe, sowie die elektrophysiologischen Störungen durch die Nekrose und narbige Abheilung, bestimmen die schlechte Prognose des Patienten. Gefährdet ist er vor allem durch

Rhythmusstörungen und den Übergang in eine systolische und diastolische Herzinsuffizienz.

1.3 Die myokardiale Ischämie / Reperfusion

Um die hohe Mortalität eines Akutinfarkts und die unbefriedigende Langzeit-Prognose zu verbessern, wird auf eine umgehende Wiedereröffnung oder Umgehung der verschlossenen Koronarien gesetzt, möglichst noch vor Eintritt irreversibler Schädigungen der Kardiomyozyten (ESC-Leitlinien Akutes Koronarsyndrom (ACS): Zeitschrift für Kardiologie, Band 93, Heft 1 Z Kardiol 93:72-90 (2004) .

Doch diese Therapie hat ihre Grenzen. Seit etwa 20 Jahren ist bekannt, dass auch die pharmakologische oder mechanische Reperfusion des zuvor ischämischen Myokards, auch wenn sie oft lebensrettend ist, nicht ausschließlich positive Effekte hat[8]. Dieser, unter anderem durch schnelle Änderungen der Gewebebedingungen und toxische Intermediate mit Radikaleigenschaften (vor allem Superoxid- und Stickstoffoxidradikale) verursachte Reperfusionsschaden, ist durch eine Mischung aus nekrotischem und vor allem apoptotischen Untergang von Myozyten gekennzeichnet und im Nekroserandbereich lokalisiert[4, 9, 10]. Der oxidative Stress in der Reperfusion kann so für bis zu 50% des Myokardschadens im Frühinfarkt verantwortlich sein[11]. Die gefürchteten Reperusionsarrhythmien, die pathophysiologischen Derrangements des kontraktilen Apparates und die transiente myokardiale Dysfunktion („Myokardiales Stunning“) sind klinischer Ausdruck dieses Effekts. Durch den weiteren Verlust kontraktiler Kardiomyozyten, der noch weitere Tage später fortschreiten kann, kann eine Progression in eine akute Herzinsuffizienz und damit Verschlechterung Prognose für den Patienten die Folge sein.

1.4 Mechanismen des Ischämie-Reperfusionsschadens auf zellulärer Ebene

Jede Zelle generiert lebenswichtiges ATP in der mitochondrialen Atmungskette, als letzten Schritt der Verwertung von Nährstoffen zu Kohlendioxid und Wasser. Mitochondrien sind komplexe zelluläre Organellen mit einer relativ durchlässigen, aber starren äußeren Lipid-Doppelmembran und einer impermeablen, stark zu so

genannten *Christae* gefalteten, Innenmembran. Hier wird durch die Translokation von Protonen zur Außenseite der Membran ein elektrochemisches Potential erzeugt ($\Delta\psi_m$), welches die treibende Kraft für die durch die F_1/F_0 ATPase katalysierte Reaktion von ADP und Phosphat zu ATP ist. Die Protonentranslokation vollzieht sich durch die Übertragung energiereicher Elektronen über vier Häm-tragende-Komplexe unter Beteiligung von *Cytochrom c* auf molekularen Sauerstoff, der schlussendlich mit Protonen zu Wasser reagiert[12-14].

Bei Störungen dieses Atmungszyklus, durch den dauerhaften Abfall der Sauerstoffkonzentration und der Nährstoffzufuhr in der Ischämie, bricht mangels Elektronenakzeptor Sauerstoff der Elektronenfluss und die elektrochemische Potentialdifferenz zusammen. Als Gegenmaßnahme zur Wiederherstellung des Potentials arbeitet die F_0/F_1 ATPase rückwärts und *verbraucht* zusätzlich ATP[15-18]. Kurz kann die anaerobe Phase durch Umstellung auf anaerobe Stoffwechselbedingungen überbrückt werden, was jedoch eine starke Ansäuerung des Gewebes zur Folge hat. Als Folge des Abfalls energiereicher Verbindungen kommen nach und nach alle energieabhängigen Prozesse zum Erliegen.

Hierunter fallen nicht nur die Kontraktionen, die auf die „Weichmacherfunktion des ATP“ angewiesen sind, und die elektrophysiologischen Vorgänge, sondern vor allem die Integrität der Membranen, welche durch energieabhängige, membranständige Ionenpumpen und ihrer osmotisch regulierenden Aktivität aufrechterhalten wird. Der Ausfall dieser Ionenpumpen verursacht auch die mangelnde Ausschleusung von Kalzium-Ionen, deren zyklische intrazelluläre Konzentrationsschwankungen den Kontraktionsvorgang initiieren. Dieser übermäßige Kalziumeinstrom führt an den kontraktilen Filamenten zu einer Hyperkontraktur, die sich bis zur Zerreißung der Filamente steigern kann. Der Kalziuminflux setzt sich bis in viele Zellorganellen und vor allem in das sarkoplasmatische Retikulum und die mitochondriale Matrix fort[19, 20]. Während der Reperfusion ändern sich nun rasend schnell verschiedene Gewebebedingungen.

Die durch den fehlenden Sauerstoff unter Substratmangel gelittene mitochondriale Innenmembran ist mit ungepaarten Elektronen tragenden Semichinonen angefüllt, welche nun unkontrolliert Elektronen auf den wieder verfügbaren Sauerstoff übertragen und dabei massiv verschiedene Sauerstoffradikale erzeugen.

Zusammen mit Stickstoffmonoxid formen Sauerstoffradikale nun das extrem kurzlebige, aber reaktionsfreudige Peroxynitrit. Zunächst können zelluläre Abbau-

Mechanismen für Radikale wie die Superoxid-Dismutase (wandelt Sauerstoffradikale in Wasserstoffperoxid um) und die Enzyme des Glutathion-Stoffwechsels (entgiften reaktive Nitroso-Verbindungen), die radikalinduzierten Schäden minimieren. Durch die limitierte Glutathionverfügbarkeit und den enormen Radikalschub sind sie jedoch bald überfordert[21, 22].

Hält dieser Zustand an, zerreißen schließlich intra- und extrazelluläre Membranen durch den unkontrollierten Ionen- und Wassereinstrom. Die Freisetzung lysosomaler Enzyme degradiert Proteine und Nukleinsäuren, der Austritt chemotaktischer intrazellulärer Proteine in den Extrazellularraum verursacht eine weitere Gewebeschädigung durch die Initiierung einer inflammatorischen Reaktion.

1.5 Der Zelltod (Apoptose vs. Nekrose)

1.5.1 Apoptose oder programmierter Zelltod

Apoptose, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, ist ein notwendiger Prozess, der im Rahmen von Zellwachstum und -Entwicklung eine wichtige Rolle spielt und für die Regulation des Immunsystems und für Gewebehomöostase verantwortlich ist[23]. Der Begriff "Apoptose" wurde von Kerr, Wyllie und Currie geprägt, die damit eine Reihe morphologischer Veränderungen definierten, die in Lebergewebe nach Entzug von Wachstumsfaktoren zu beobachten waren[24]. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass apoptotische Zellen eine charakteristische Abfolge zytologischer Veränderungen aufwiesen, die durch die Aktivierung degradierender Enzyme, wie *Nukleasen* und *Proteasen*, hervorgerufen werden. Diese als *Caspasen* bezeichneten Enzyme sind Cystein- Aspartat-Proteasen, die alle als inaktive Zymogene synthetisiert und durch proteolytische Spaltung in ihre aktiven Stufen überführt werden. Einmal aktiviert, schneiden sie Proteine, die dadurch inaktiviert oder zerstört werden. Eine Caspase aktivierte DNase schneidet das Chromatin, was letztendlich zu den typischen apoptotischen Veränderungen im Nukleus der Zelle führt[25, 26]. Beteiligt ist hier auch eine *Poly-ADP-Ribose-Polymerase-1 (PARP)*, welche *Poly-ADP-Ribose*-Reste an nukleäre Proteine heftet und so Apoptose fördert [27]. Zunächst entstehen 50, 150 und 300 kb große DNA-Fragmente [28, 29]. In einer zweiten Phase der DNA-Spaltung entstehen DNA-Fragmente mit einer Größe von 180 bp und ganzzahligen Vielfachen davon, die als Mono- und Oligonukleosomen bezeichnet werden. Zudem bilden Membranen bläschenförmige Ausstülpungen (Zeiose, Vorstufe der später auftretenden „*apoptotic*

bodies“), die biochemisch mit dem Verlust der Membranasymmetrie einhergehen. Phosphatidylserine werden an der Zelloberfläche exponiert und spezifisch durch Fresszellen erkannt, was Phagozytose und Elimination dieser apoptotischen Körperchen zur Folge hat. Dadurch wird sichergestellt, dass alternde oder geschädigte Zellen in einer kontrollierten Weise eliminiert werden, ohne dass eine inflammatorische Begleitreaktion auftritt, die benachbarte intakte Zellen oder die extrazelluläre Matrix schädigen könnten[30]. Obwohl Apoptose und Nekrose grundsätzlich verschiedene Charakteristika aufweisen, und daher voneinander unabhängig scheinen, zeigen einige Studien, dass beide Prozesse unter bestimmten Bedingungen miteinander gekoppelt sind[15, 31].

Es wird in der Apoptose unterschieden zwischen einem extrinsischen Pfad der Apoptose-Initiierung, in dem *Death-Liganden* wie *FAS* und *TNF-alpha* an Zellrezeptoren binden, die letztendlich zur Rekrutierung und Aktivierung von *Caspase 8* führt und einen intrinsischen Pfad, der sich an der mitochondrialen Membran abspielt.

Im intermembranösen Spalt der Mitochondrien befinden sich verschiedene Proteine (*Cytochrom c*, *Apoptosis inducing Factor (AIF)*, *Smac/Diablo*, *Endo G*, *Omi*, etc.), die alle von nukleären Genen kodiert werden, als inaktive Vorstufen durch das Zytosol in den Membranzwischenraum importiert und dort in aktive Formen umgewandelt werden[14, 32-34]. Das *Cytochrom c* liegt im intermembranösen Spalt größtenteils in Einfaltungen der inneren Membran an *Cardiolipine* gebunden vor, nur etwa 15% sind frei verfügbar. Die erneute Freisetzung in das Zytosol löst sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Vorgänge aus, die eine apoptotische Morphologie des Zelltodes hervorrufen. Wichtigster Vertreter ist das *Cytochrom c* welches nach Freisetzung ins Zytosol an *APAF-1* (apoptotic protease activating factor) bindet und in einem ATP abhängigen Prozess *Pro caspase-9* aktiviert. Dieses Enzym kann kaskadenartig sowohl andere *Caspase-9* Moleküle, wie auch die Effektor *Caspasen 3* und *7* aktivieren und somit Apoptose auslösen[35].

Über den Mechanismus der *Cytochrom c* Freisetzung, speziell in der Ischämie Reperfusion gibt es verschiedene Modelle.

1.5.2 *BCL*-Familie und Apoptose-Regulation in der Ischämie Reperfusion

Der Kardiomyozyt, wie auch andere Zelltypen verfügt über spezifische Proteine, die in die Regulation von Zelltod und Überleben eingebunden sind[36]. Diese BCL-Proteinfamilie (*B-Cell-Leukemia*) gliedert sich in anti-apoptotische BH1-4 Domänen- (*BCL-Homolog*) tragende Proteine wie *BCL-2* und *BCL-X_L*, die sich in nukleären, sarkoplasmatischen und mitochondrialen Membranen inserieren und eine Durchlässigkeitskontrollfunktion besitzen. Weiterhin unterscheidet man pro-apoptotische BH1-3 Domänen-tragende Mitglieder, wie *BAX*, *BAK*, *BAM* etc. und pro-apoptotische Mitglieder, die nur die BH3 Domäne tragen, wie *Bad* und *Bid*, die zytosolisch lokalisiert sind, aber unter verschiedenen Stimuli und konformationellen Veränderungen multimerisieren und an intrazelluläre Membranen rekrutiert werden. Den nur- BH3 tragenden Mitgliedern wie *Bad*, wird hierbei eine „*upstream-sentinel*“ Funktion zugesprochen. Sie reagieren auf Todes- und Überlebenssignale und beeinflussen anschließend *BCL-2* und *BCL-X_L* durch Bindung und Hemmung ihrer Funktionen an den Membranen[37-39].

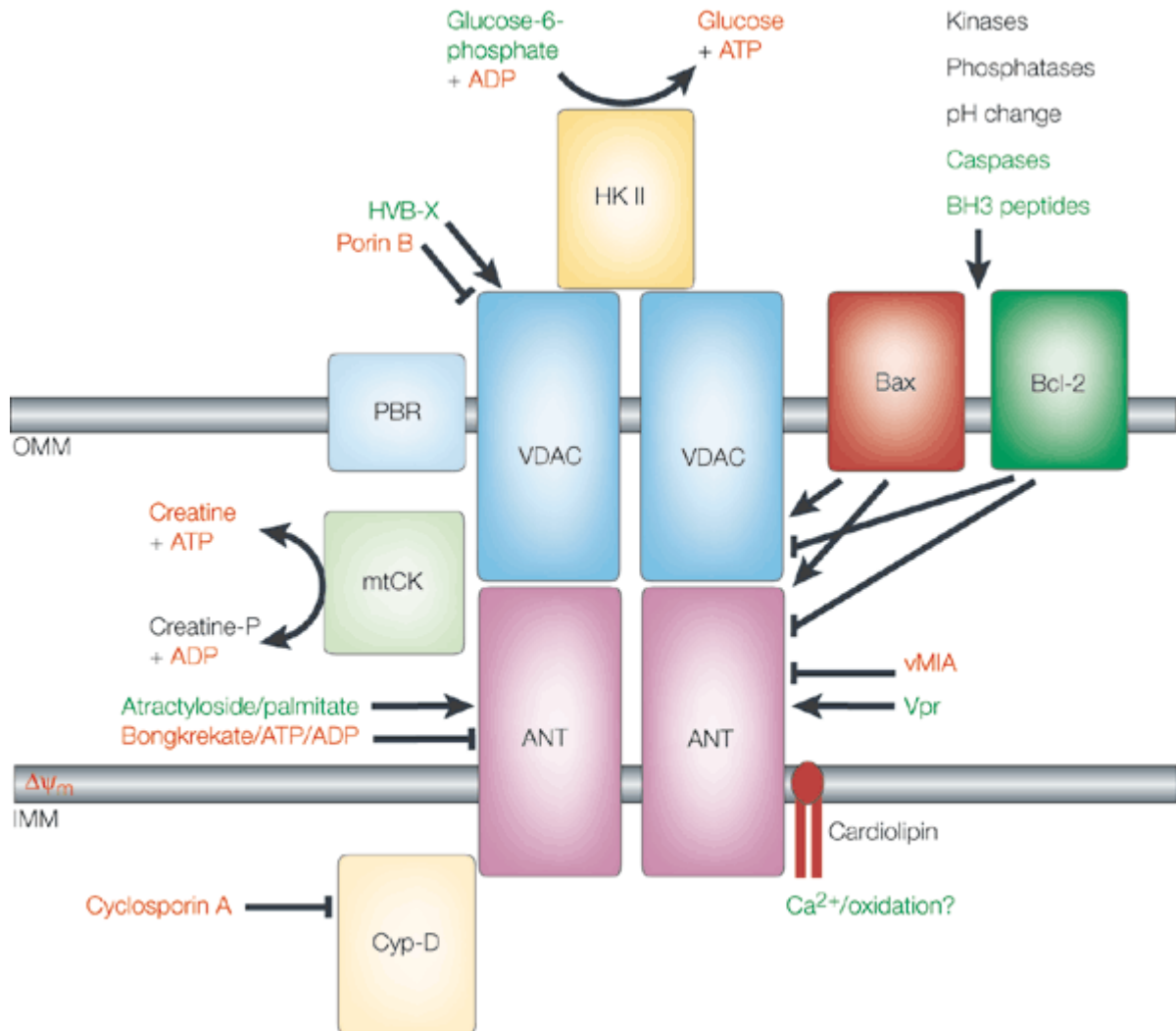
Über einen noch nicht endgültig definierten Vorgang, werden z.B. *BAX* Proteine in der Ischämie-Reperfusion als Homo-Oligomere, oder aber als Hetero-Oligomere mit geschnittenen *Bid* Molekülen aus dem Zytosol, wo sie an verschiedene Proteine (*HSP60*) gebunden vorliegen, an die mitochondriale Außenmembran transloziert, wo sie direkt Poren schaffen, die groß genug sind, um Cytochrom c freizusetzen. Dieser Vorgang, wird von den anti-apoptotischen Mitgliedern *BCL-X_L* und *BCL-2* gehemmt[40, 41].

Eine Rolle scheint hier zusätzlich die radikalinduzierte Lipidperoxidierung zu sein, die auch das Cardiolipin im intermembranösen Spalt derart modifiziert, dass sie Cytochrom c freigeben[42, 43].

1.5.3 Die *Mitochondriale Permeability-Transition*: Effektor im programmierten und unkontrollierten Zelltod

Ein weiteres Modell setzt die Formation eines in Mitochondrien beide Membranen durchspannenden Kanals voraus, der über den Einstrom von Molekülen unter 1500 Dalton wie Kalzium, Kalium, Magnesium und Wasser zu Schwellung der Matrix, Entfaltung der Cristae und passiven Dehnung der Außenmembran führt, die massiv

genug ist, um Cytochrom c und andere pro-apoptotische Moleküle ins Zytosol zu entlassen[44]. Dieser als „*Mitochondrial Permeability Transition*“ (MPT) bezeichnete Kanal besteht aus verschiedenen Komponenten: Dem Adenin-Nukleotid-Translokator, dem Voltage dependent Anion Channel (VDAC), der Kreatinkinase, der zytosolischen Hexokinase und Cyclophilin D[15, 45, 46].



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Abbildung aus[47]

Was MPT auslöst ist ebenso kontrovers. Die Initiierung über pro-apoptotische BCL-Mitglieder BAX und BAK allein und in Verbindung mit Bid und Bad etc. ist beschrieben, ebenso wie die Hemmung der über BCL2 und BCL-X_L. Auch Anstieg des PH Wertes und Abfall des elektrochemischen Potentials, können Trigger für MPT sein.

Die aber wohl wichtigsten Initiatoren in der Reperfusion, sind der hohe Kalziumgehalt und Reaktive Sauerstoffspezies, wie z.B. Superoxid, Peroxynitrit und andere, die die Protein- und Lipidkomponenten derart verändern, dass die Pore bevorzugt in den geöffneten Zustand übergeht. Kalzium-Ionen lösen nicht nur direkt MPT aus, sondern führen über die Aktivierung der Kalzium abhängigen Phosphatase *Calcineurin* und die darauf folgende Dephosphorylierung von *Bad*, auch indirekt zu einer Steigerung des Cytochrom c-Ausstoßes. Während diese Öffnung in der Ischämie, durch Senkung des Schwellenwertes und Translokation pro-apoptotischer BCL-Mitglieder quasi vorbereitet wird ist sie jedoch durch den niedrigen PH, nur geringe Radikalspiegel und das erhöhte Magnesium unterdrückt (*MPT Priming*)[48]. Erst der zytosolische Kalzium- und Radikalschub in der Reperfusion, der PH Anstieg bei normalisierendem Magnesium löst schubartig generalisierte MPT aus und erhöht die zytosolische Verfügbarkeit von *Cytochrom c*[49]. Der einsetzende progrediente mitochondriale *Cytochrom c* Verlust führt wiederum zum Kollaps der Atmungskette, ähnlich wie in der Ischämie. Nun determiniert sich ob und welche Modalität des Zelltods der Kardiomyozyt unterläuft[50]. Sind die Veränderungen in der Ischämie-Reperfusion gering gewesen, also das elektrochemische Potential weitestgehend intakt erholt sich die mitochondriale Energiegewinnung und damit auch die Zelle allmählich[51]. Ist $\Delta\Psi_m$ moderat abgesunken, die Verschiebungen von *Cytochrom c* ins Zytosol mäßig und der Rest-ATP Spiegel ausreichend, kann die Zelle die apoptotische Kaskade ausführen. Sind die ATP Reserven nicht mehr ausreichend und die *Cytochrom c* Spiegel sinken intramitochondrial massiv, kollabiert schließlich $\Delta\Psi_m$ [52] und die Zelle stirbt einen nekrotischen Zelltod, ohne fähig zu sein, Apoptose zu aktivieren[15, 45, 46, 53].

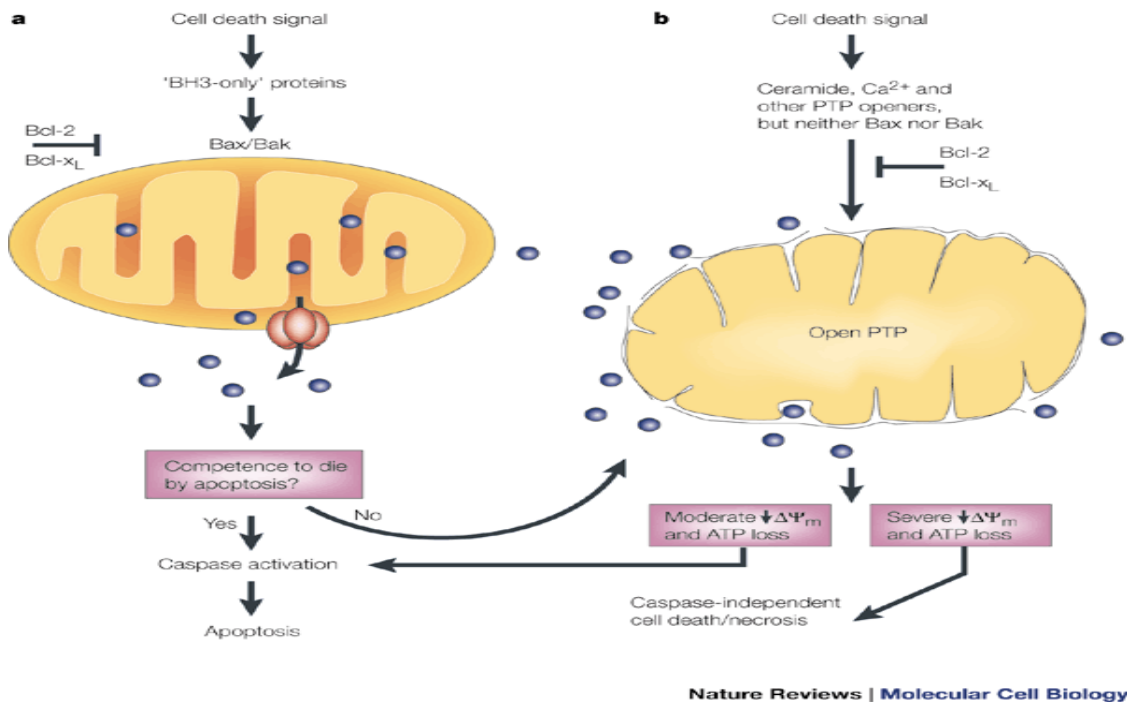


Abbildung aus[33]

1.6 Adaptive und protektive Mechanismen des ischämischen Myokards

1.6.1 Das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung und Postkonditionierung

Wie alle Gewebe und Zellen des Körpers ist auch das Myokard externen und internen Stressoren nicht reaktionslos ausgeliefert. Auch der Kardiomyozyt verfügt über Mechanismen, die ihn vor akuten und zukünftigen Zellschäden schützen können[54, 55].

Der Begriff der ischämischen Präkonditionierung beschreibt das Phänomen, dass sowohl *in vitro*, als auch *in vivo*, kurze, subletale ischämische Episoden in der Lage sind, vor zukünftigem Ischämie- und Ischämie-Reperfusionsschaden zu schützen[56, 57]. Postkonditionierung hingegen meint die Auslösung einer repetitiven, kurzzeitigen Folgeischämie-Reperfusion des Myokards nach der eigentlichen ischämischen Episode selbst. Auch hierfür sind kardioprotektive Auswirkungen beschrieben.[58, 59]

Diese Protektion wird auf diverse intrazelluläre Adaptionsmechanismen, wie die Alteration von Genexpression und die Aktivierung humoraler, autokriner und parakriner Systeme zurückgeführt. Diese Faktoren binden ihre spezifischen

Zellmembran-Rezeptoren und induzieren dadurch die Aktivierung zellulärer Überlebenspfade[60].

Maßgeblich über diese Zellüberlebenspfade wirken auch diejenigen Proteine, für die eine kardioprotektive Wirkung in der Ischämie Reperfusion nachgewiesen wurde.

Zum einen sind vielfach die gp130 Agonisten aus der Interleukin-6 Familie, *Leukemia-Inhibitory-Faktor*[61, 62] und *Cardiotrophin-1*[63], die über beide dargestellten Pfade zellschützende Wirkungen besitzen, in der myokardialen Ischämie-Reperfusion beschrieben. Zudem sorgen sie am Kardiomyozyten für die Expression fetaler, Hypertrophie assoziierter Gene und damit auch für eine Adaption an die neue Gewebesituation.

Aber auch für typische Liganden der Rezeptortyrosinkinase-gekoppelten-Rezeptoren wie Insulin und *Insulin-like-growth factor 1*[64], sowie *Nerve-growth factor* und *Platelet derived growth factor*, *Fibroblast growth factor* und *Hepatocyte growth factor* sind unterschiedliche kardioprotektive Wirkungen dokumentiert, obwohl nicht alle diese Proteine aus dem Kardiomyozyten selbst stammen[54].

Auch Hormone wie Erythropoetin[65] und Adrenomedulin[66], die aus anderen Organen in das Blut abgegeben werden konnten das Herz vor Infarktschäden partiell schützen. Auch das im Kardiomyozyten durch Ischämie induzierte *Transforming Growth Factor beta* schützt den Myozyten vor Ischämie Reperfusion assoziierter Apoptose. Zugleich führt TGF-beta über eine Aktivierung von Fibroblasten zur Narbenbildung und zunehmender Fibrosierung des Myokards[67, 68].

Trotz dieser autokrinen, parakrinen und humoralen Schutzfaktoren ist das Myokard jedoch nur partiell in der Lage, den Zellschaden zu minimieren, vor allem deshalb, weil diese Anpassungsmechanismen meist zu spät anlaufen. Pathologische Folgen dieser und anderer Kompensationsversuche wurden bereits unter dem Terminus *myokardiales Remodelling* beschrieben.

Und auch die therapeutische Applikation einzelner Substanzen konnte bis dato nur marginale Erfolge im Tierversuch erzielen. Nur wenige Substanzen fanden ihre Anwendung in klinischen Verfahren an menschlichen Patienten.

1.7 PI3Kinase-AKT-Bad-Zellüberlebenspfad

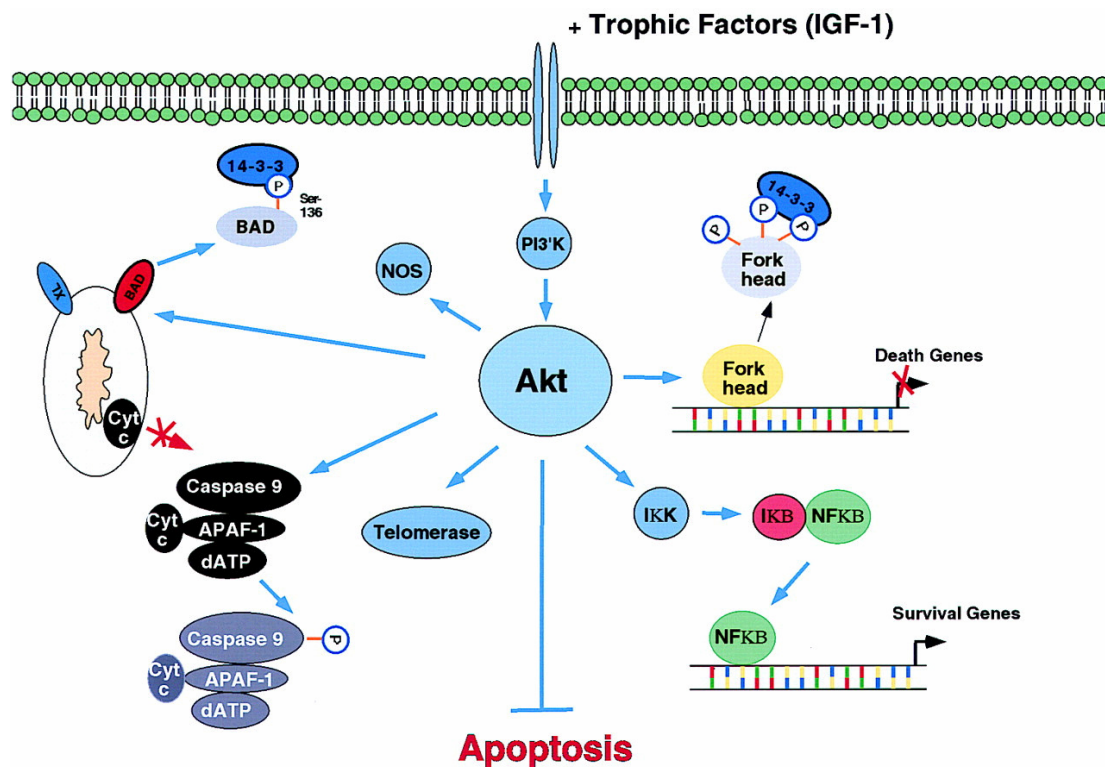


Abbildung: Schematische Darstellung des PI3-AKT-Bad-Zellüberlebenspfads^[69]

Die PI3Kinase ist ein heterodimeres membranständiges Enzym, bestehend aus einer regulatorischen und katalytischen Untereinheit. Die als p85 bezeichnete regulatorische Untereinheit steht direkt oder über Insulin-Rezeptor-Substrate mit Rezeptor-Tyrosin-Kinasen in Verbindung. Sobald spezifische Liganden an ihre Rezeptoren binden, führt dies zu Rezeptordimerisierung, Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinreste des Rezeptors und zur nachfolgenden Aktivierung der PI3Kinase.

Die PI3 Kinase katalysiert die Phosphorylierung von Phosphoinositolbisphosphat ($\text{Ptlns}(4,4)\text{P}_2$) an Position 3 zu $\text{Ptlns}(3,4,5)\text{P}_3$. Eine Reaktion, die durch ihren Antagonisten PTEN umgekehrt wird.

Die Akkumulation von $\text{Ptlns}(3,4,5)\text{P}_3$ führt zur Membran-Rekrutierung von Proteinen mit Pleckstrin-Homolog, wie der Phosphoinositol-abhängigen-Kinase 1 (PDK-1) und der Serin/Threonin-Proteinkinase AKT (auch PKB). Über die Lipidbrücke $\text{Ptlns}(3,4,5)\text{P}_3$ an die Membran in großer Nähe gebunden, wird AKT über die PDK-1 und eine noch nicht genau bekannte PDK-2 an den Threoninresten 308 und dem Serinrest 473 phosphoryliert. Einmal aktiviert phosphoryliert AKT selbst eine große

Anzahl von Substraten, die über unterschiedliche Mechanismen in das Zellüberleben eingreifen und direkt Apoptose unterdrücken können[39, 69-72].

Die Phosphorylierung und damit Inaktivierung der Gycogensynthase-3-beta greift in den Glucosestoffwechsel ein, fördert über mTOR die Proteintranslation und über NFAT Aktivierung kardiomyozytäre Hypertrophie.

Über die Phosphorylierung und Aktivierung der endothelialen NO-Synthase an Ser1177 erhöht AKT die NO Bioverfügbarkeit, welche gerade im Endothel anti-thrombogen, anti-entzündlich und pro-angiogenetisch wirkt und in der Gefäßmuskulatur zur Dilatation führt [73].

Die Phosphorylierung von Bad an Serin 136 führt zur Komplexbildung mit dem zytosolischen Protein 14-3-3, und unterbindet so die mitochondriale Translokation und die pro-apoptotische Funktion über die Hemmung von BCL-2 und BCL-X₂.

Diese AKT-abhängige Phosphorylierung von Bad an Serin 136 ist erst kürzlich mit dem Phänomen der ischämischen Präkonditionierung in Verbindung gebracht worden. Es ließ sich demonstrieren, dass Präkonditionierung über die PI3Kinase zu einer Bad-Phosphorylierung führt, und das eine Hemmung der PI3Kinase über spezifische Inhibitoren, das Phänomen der IPC signifikant abschwächt[74].

1.8 *GDF-15/MIC-1* ist eine neues divergentes Mitglied der *TGFβ* Familie

Unter der wachsenden Anzahl an TGFβ-Familienmitgliedern befindet sich seit 1997 auch das zunächst als Macrophage-Inhibitory-Cytokine-1 bezeichnete Zytokin GDF-15/MIC-1. Es wurde von der Arbeitsgruppe um Bootcov aus der cDNS aktivierter Makrophagen isoliert und als Mitglied der TGFβ Familie charakterisiert. Die Aktivierung der Makrophagen wurde hierbei auch durch Stimulation mit verschiedenen Zytokinen erreicht (TNF-alpha, Interleukin 1β, 2, 6; c-GSF, nicht aber Interferon und LPS). Seine Bezeichnung erhielt das Zytokin, aufgrund der Indizien, dass Vor-Stimulation von Makrophagen mit MIC-1 die Lipopolysaccharid induzierte TNF-alpha Freisetzung hemmen konnte[75]. Interessanterweise konnten erhöhte basale Serumkonzentrationen von GDF-15 in Frauen, unabhängig von klassischen Risikofaktoren, mit dem zukünftigen Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse korreliert werden. Bei erhöhten GDF-15-Spiegeln erhöhte sich auch das Risiko für Myokardinfarkt, thrombembolischer Apoplex und plötzlichen Herztod um nahezu das

dreifache[76]. Obwohl die Autoren, diese erhöhten Serumspiegel auf die Aktivitätszunahme der Makrophagen im Rahmen der Arterioskleroseprogression zurückführten, blieb die Frage, was letztendlich die Serumspiegelerhöhung verursacht, nicht abschließend beantwortet. Über die Regulation der GDF-15 Genexpression ist unterschiedliches bekannt. Lokalisiert ist es im Genom auf dem kurzen Arm von Chromosom 19, als aus 2 Exons bestehende etwa 38000 Bp lange Sequenz, aus der eine etwa 1250bp lange mRNA transkribiert wird. Es wird ähnlich, wie andere Mitglieder der TGF β Familie, als etwa 308 Aminosäuren großes Precursorprotein synthetisiert, welches neben dem 29 Aminosäuren umspannenden Signalpeptid, ein 167 Aminosäuren großes Pro-Peptid, sowie das 112 Aminosäuren große reife GDF-15/MIC-1 enthält. Auch lässt sich in der Struktur des Proteins, die charakteristische Sieben-Cystein Domäne nachweisen, Die im Falle des GDF-15/MIC-1 80 Aminosäuren umspannt.

Über das Signalpeptid wird der Precursor in das endoplasmatische Retikulum transloziert, dort strukturell gefaltet und zu einem über Disulfidbrücken stabilisierten Pro-Dimer verknüpft. Erst dann erfolgt der Transport in den zellulären Golgi-Apparat, in dem eine Furin-ähnliche-Protease an der RRAR-Sequenz das Pro-Peptid abgespalten und das reife etwa 30 kDA GDF-15/MIC-1-Dimer freigesetzt wird. Wie bei anderen TGF β -Familienmitgliedern wird das Pro-Peptid glykosyliert und ebenfalls in den Extrazellulärraum sezerniert[77].

Die Aminosäuresequenz-Homologie zu anderen TGF- β Zytokinen ist trotz der strukturellen Ähnlichkeit außerordentlich gering. Sie schwankt zwischen 15% bei TGF- β und 29% bei BMP 5,6, was verdeutlicht, dass GDF-15/MIC-1 möglicherweise ein erstes Mitglied einer neuen Subfamilie repräsentiert[75, 78].

Der GDF-15 Promotor weist Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren SP1, SP2 und AP-2, AP-4 auf, sowie für die Transkriptionsfaktoren p53, AP-1, und EGR-1[79-84]. Letztere verdeutlichen die Induktion von GDF-15 im Rahmen von zellulärem Schaden und Stress unterschiedlicher Genese. Denn sowohl p53, wie auch AP-1 und EGR-1 sind dafür bekannt, dass sie im Rahmen von Zell- und DNS Schäden unterschiedlicher Genese, sowie auch durch oxidativen Stress und Ischämie die Transkription ihrer Zielgene aktivieren können[85-87]. Auch spielen sie im Rahmen von Zellüberleben und Zelltod eine bedeutende Rolle.

Nicht überraschend konnten so erhöhte GDF-15 Spiegel in nekrotischen Arealen nach Leberschäden[88], sowie nach Strahlenschäden[89], Intoxikationen,

Kryoschädigungen in Neuronen, Anoxie und Behandlung mit Inhibitoren der Cyclooxygenase, wie Acetylsalicylsäure und Indomethacin gefunden wurden[78].

In verschiedenen Tumorerkrankungen wurden Funktionen von GDF-15 untersucht und nachgewiesen. So wurde es in Prostatakarzinomen und Lungenkarzinomen, Brustkarzinomen und Pankreaskarzinomen, sowie in Karzinomen des Gastrointestinaltrakts überexprimiert gefunden. In den meisten Studien konnte eine anti-tumorigene Wirkung in vitro und in vivo nachgewiesen werden, die sowohl auf eine Hemmung des G1-Zellzyklus zurückzuführen war, wie auch auf eine pro-apoptotische Wirkung auf Tumorzellen[89, 90]. Im Gegensatz dazu stehen einige Wirkungen, die vielmehr auf eine trophische, zellprotektive Funktion schließen lassen.

So konnte nachgewiesen werden, dass GDF-15, welches im ZNS hauptsächlich in den Epithelien des Plexus Choroideus gebildet und in den Liquor sezerniert wird, sowohl intoxikierte dopaminerge Mittelhirnneuronen schützen kann, wie auch die Transmitteraufnahme in serotonerge Rapheneuronen steigert[91].

In der gleichen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Stimulation mit GDF-15 Kleinhirnneuronen vor dem apoptotischen Zelltod schützen kann. Dieser protektive Effekt war über eine Aktivierung des PI3K-AKT-GSK3 β Überlebenspfades und zum zweiten durch eine Hemmung der ERK1/2 Aktivierung vermittelt. So konnte zum ersten Mal eine direkt kausale Beziehung zwischen der Stress induzierten Steigerung der GDF-15 Expression in Neuronen und zytoprotektiven Wirkungen hergestellt werden.

Ein weiterer Befund beschrieb die Induktion der GDF-15 Genexpression, parallel zu der von VEGF, in Glioblastomzellen durch anhaltende Anoxie. Anoxische Bedingungen führten hierbei zu einer p53 und HIF-1 Alpha (Regulatoren der Hypoxie-induzierten VEGF Expression) unabhängigen Akkumulation des intrazellulären Precursors, während Reoxygenierung zu einer gesteigerten Prozessierung und Sezernierung führte[92].

Diese Vorarbeiten zeigen eine Involvierung von GDF-15 in die zelluläre Stressantwort, die Reaktion auf Hypoxie und Mangelversorgung, aber auch die Regulation von Zelltod und Zellüberleben. Da ein solcher Kontext in der kardiovaskulären Pathophysiologie eine herausragende Rolle spielt, soll in dieser Arbeit die Rolle von GDF-15 im Rahmen der Stressantwort des Myokards in der Ischämie und Ischämie-Reperfusion genauer untersucht werden.

2. Problemstellung der Arbeit

Aufgrund der Tatsachen, dass es sich bei GDF-15/MIC-1 um ein, durch verschiedene zelluläre Stressoren induzierbares Zytokin handelt, welches offensichtlich im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen eine Rolle zu spielen scheint, soll die genaue Rolle und Bedeutung von GDF-15/MIC-1 im Rahmen der Koronaren Herzerkrankung untersucht werden.

- 1.) Wird GDF-15 auch im Myokard exprimiert und durch verschiedene zelluläre Stressoren, wie Ischämie und Reperfusion reguliert?
- 2.) Wie sind die Mechanismen der GDF-15 Regulation im Myokardgewebe, insbesondere im Kardiomyozyten?
- 3.) Welche Funktionen hat GDF-15 Expression, Induktion und Stimulation im myokardialen Verband?
- 4.) Spielt GDF-15 eine Rolle in der Modulation des Zellüberlebens und Zelltodes in der myokardialen Ischämie-Reperfusion, vor allem im Kardiomyozyten?
- 5.) Wie sind die Mechanismen der Effekte einer GDF-15 Stimulation im Kardiomyozyten?

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Geräte

Gerät

Analysenwaage O 3000-X
Autoklav K 56
Real-time Multiplex PCR
Eismaschine
PCR Thermocycler
Fluoreszenzaktivierter Cell Sorter
Zentrifugen

Feinanalysenwaage AK 160
Entwicklungsmaschine, Optimax
Kühlschrank (4°C)
Magnetrührer
Mikroskop
Mikrowellenherd
PH-Elektrode
Photometer (mit Quarzküvette) Ultraspec 2000
Inkubator, Certomat H
Brutschrank Function Line
Hypoxie-Kammer; Flowmeter
Temperierbad IKA TER 2 (Wasserbad)
Trockenschrank
Gewebe-Hechsler Ultra Turrx T25
Vakuumpumpensystem
Ultra Mycotom –Präparateschneidemaschine
Vakuumtrockner ;Vacuumconcentrator

ELISA Reader KC4

Hersteller

Omnilab
Sterilisatoren GmbH
Stratagene
Ziegert
Eppendorf
FACS Calibur; Beckton Dickinson
Haereus Omnifuge pro 2.0
Biofresco
Mettler
Protec
Liebherr
IKA Labortechnik
Nikon, Zeiss, Leica
Sharp
Hanna Instruments
Pharmacia Biotech
Braun
Haraeus
Billups-Rothenberg
IKA-Labortechnik
Memmert GmbH
Janke&Kunkel
Heraeus
Leica CM 1900
Bachofer

Lamda Scan

3.2 Isolation und Kultivierung neonataler ventrikulärer Kardiomyozyten aus Sprague-Dawley-Ratten

3.2.1 Lösungen:

Zellkulturwasser

Autoklaviertes Millipore H₂O

Enzymlösung

0,33mg/ml Kollagenase (Cell Systems)
0,01mg/ml Pankreatin (SIGMA)
0,3ml/Herz 1x ADS

Puffer:

10x ADS Puffer 3,4g NaCl
 2,38g HEPES
 60mg NaH₂PO₄
 500mg Glucose
 200mg KCl
 50mg MgSO₄
 450ml Zellkulturwasser
 PH= 7,4
 Sterilfiltration

1x ADS (rot)

1mg Phenolrot
50ml 1x ADS
Sterilfiltration

1% Gelatine

1g Gelatine
100ml Zellkulturwasser

Percoll-Stock-Ansatz

40,5ml Percoll
4,5ml 10xADS

TOP-Percoll

18ml Percoll-Stock
22ml 1xADS

Bottom Percoll

26ml Percoll Stock
14ml ADS rot

Medien:

Plating Medium

4 Teile DMEM
1 Teil Medium 199
10% inaktiviertes Pferdeserum
5% inaktiviertes fetales Kälberserum
1% L-Glutamin
1% Penicillin/Streptomycin
Sterilfiltration

Maintenance Medium:

4 Teile	DMEM
1 Teil	Medium 199
1%	L-Glutamin
1%	Penicillin/Streptomycin
Sterilfiltration	

3.2.2 Vorgehensweise:

Präparation der Herzen: Zur Kardiomyozytenisolierung wurden ein bis drei Tage alte Sprague-dawley Ratten verwendet, deren Zucht durch die zentralen Tierlaboratorien der Medizinischen Hochschule Hannover vorgenommen wurden.

Nach Desinfektion mit 70%iger Ethanollösung wurden etwa neunzig bis einhundert neonatale Ratten dekapitiert, und nach Spreizung des Thorax die Herzen inklusive Vorhöfen und Gefäßstumpf entnommen. In eisgekühltem 1x ADS gesammelt, wurden anschließend die Ventrikel von den proximal gelegenen Herzstrukturen getrennt und in etwa sechs bis acht Gewebestücke zerkleinert.

Gewebefragmente aus etwa fünfzig Tieren wurden in einem 50 ml Falcon mitsamt ADS gepoolt und der überschüssige Puffer schließlich verworfen.

Um aus den Myokardstückchen die einzelnen Zellbestandteile lebend herauszulösen, führte man zunächst einen „Vorverdau“ durch, in dem die Gewebeteile mit etwa 0,3ml Enzymlösung 10 Minuten bei 37°C unter permanenter Rotation inkubiert wurden. Der unter anderem noch Blutbestandteile und nicht verwertbare Herzbestandteile enthaltende Überstand konnte anschließend verworfen werden.

Durch Zugabe von jeweils 14-15ml frischer Enzymlösung und 20 minütigem Verdau erhielt man nun eine zellhaltige Suspension, deren Rest-Enzymaktivität man durch 1 ml in Falcon Röhrchen vorgelegtes FCS neutralisierte. Dieses Röhrchen wurde bei 700 rpm 5 Minuten zentrifugiert, und nach der Zentrifugation resultierende Zellpellet wurde jeweils durch Dekantierung vom Überstand befreit, mit 0,5-1ml FCS resuspendiert und bei 37°C, sowie 5% CO₂ im Brutschrank gesammelt.

Nach nahezu vollständigem Verdau, wurden die gesammelten Zellfraktionen erneut 7Minuten bei 700rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Für die Dichtezentrifugation wurden die Zellen in 2ml ADS/Ansatz resuspendiert.

Trennen der Kardiomyozyten von den Nicht-Kardiomyozyten durch einen Percoll-Dichtegradienten: Kardiomyozyten unterscheiden sich von anderen myokardialen Zellen unter anderem durch ihre Dichte und ihrer differentiellen Adhäsion auf

unbeschichtetem Plastik. Ersteres macht man sich bei der Dichtezentrifugationstrennung zunutze[93, 94].

Hierzu wurde ein 15ml Falcon Röhrchen zunächst mit 4ml des *Top*-Percoll Gemisches einer geringen Dichte beladen und dann mit 3ml des Phenolrot gefärbtem *Bottom*-Percoll einer höheren Dichte unterschichtet (Dichte der oberen Schicht 1,040g/ml, Dichte der unteren Schicht 1,070g/ml). Nach nun folgender vorsichtiger Überschichtung, mit in 2ml 1x ADS resuspendierten Zellen pro Ansatz, wurden die etwa 10 Röhrchen 30 Minuten bei 1850g, ohne Bremse zentrifugiert.

So waren allein die Kardiomyozyten, durch ihre höhere Dichte, in der Lage die obere Percoll-Schicht zu durchwandern und sammelten sich an der Grenze zur unteren Percoll-Schicht. Nach vorsichtigem Absaugen des Top-Percolls und der enthaltenen Restzellen (Fibroblasten und Endothelzellen), wurden auch die Kardiomyozyten mit möglichst wenig Percoll mit abgesaugt und gesammelt. Nach zweimaligem Waschen mit ADS und jeweiliger Abzentrifugation der Kardiomyozyten wurde das resultierende Zellpellet mit 0,3ml Plating Medium / Herz resuspendiert. Die Reinheit der so erhaltenen Kardiomyozytenfraktion betrug etwa 95%.

In 5ml Plating Medium wurden nun etwa 8×10^5 Zellen auf eine mit 1%iger Gelatine beschichtete 6cm Platte in kreisförmiger Bewegung ausgesät. Die Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ übernacht, ermöglichte den Zellen ein adhärentes Wachstum und so konnten tote und nicht-adhärente Zellen am folgenden Tag durch zweimaliges waschen mit DMEM entfernt werden. Letztendlich wurden die Zellen in 2ml Maintenance Medium kultiviert.

3.2.3 Stimulation der kultivierten Kardiomyozyten mit verschiedenen Agenzien

Um die Reaktionen der Zellen auf die Stimulation mit verschiedenen Agenzien zu untersuchen wurden die Zellen 24 Stunden unter Serum-freien-Bedingungen kultiviert. Ein Teil der Kardiomyozyten wurde direkt mit humanem GDF-15 in einer Konzentration von 20ng/ml stimuliert, andere etwa 20 Minuten zuvor mit den PI3Kinase-inhibitoren Wortmannin (200nM/L) und LY294002 (10µM/L). Auch wurden für manche Experimente Leukemia-Inhibitory-Factor (1nM/L) und Insulin-like-Growth-Factor (50ng/ml) verwendet.

3.3 Simulation von Ischämie-Reperfusion im in vitro Modell

3.3.1 Medien und Reagenzien

Ischämiemedium

8,005g/L	NaCl (0,137mM)
0,984g/L	KCl (12mM)
0,1g/L	MgCl ₂ (0,49mM)
0,132g/L	CaCl ₂ (0,9mM)
0,953g/l	HEPES (10mM)
2,242g/L	Na-Laktat (20mM)
	2-deoxy-Glucose (10mM)

Kontrollmedium:

8,005g/L	NaCl (0,137mM)
0,336g/L	KCl (3,8mM)
0,1g/L	MgCl ₂ (0,49mM)
0,132g/L	CaCl ₂ (0,9mM)
0,953g/l	HEPES (10mM)
2,242g/L	Na-Pyruvat(20mM)
	Glucose (10mM)

Hypoxie-Gas

95%	N ₂
5%	CO ₂

3.3.2 Hintergrund:

Um die Auswirkungen der Ischämie und der Ischämie-Reperfusion auf kultivierte Kardiomyozyten zu untersuchen wurde ein in vitro Modell nach Vorlage von Esumi, modifiziert durch Stephanou, etabliert[63, 95-97].

Diese Bedingungen wurden imitiert, durch die Verwendung eines speziellen Elektrolyt-Mediums, unter Zusatz von 2-Deoxyglucose zur Inhibierung der Glykolyse, und der Inkubation in einer Gas-Dichten-Inkubationskammer (Billups-Rothenberg) in einer angefeuchteten Atmosphäre von 95% N₂ und 5% CO₂ bei 37°C.

3.3.3 Vorgehensweise:

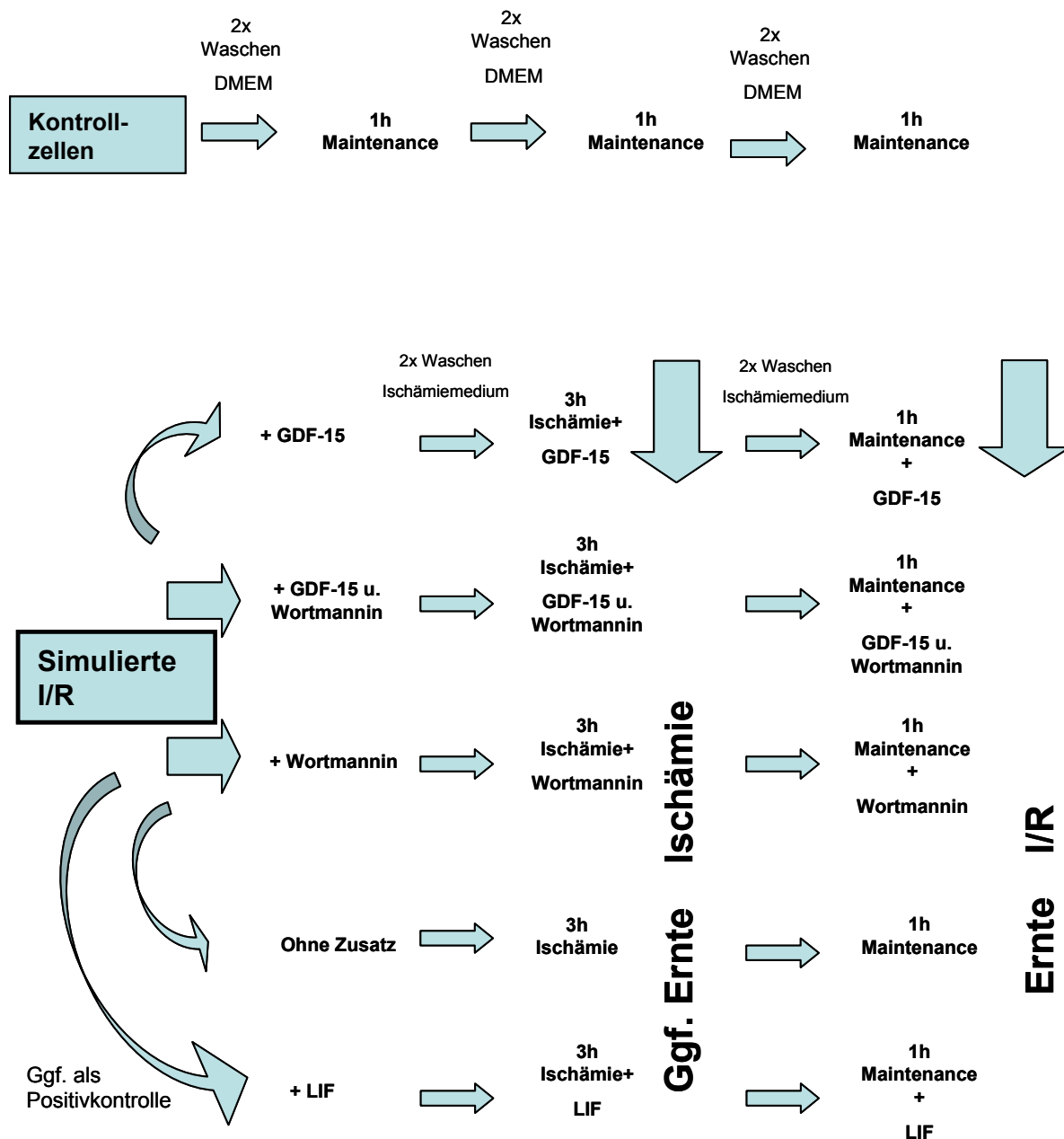
Nach 24-stündiger Kultivierung der Zellen unter Serum-Deprivation wurden die Zellen zweimal mit Ischämiemedium gewaschen, mit 2ml Ischämiemedium kultiviert und in der Hypoxie-Kammer, in einer leicht angefeuchteten Atmosphäre, gasdicht eingeschlossen. Nun wurden die Zellplatten etwa 15 Minuten bei einer Flussgeschwindigkeit von 10L/min mit einem Stickstoff/Kohlendioxid-Gemisch begast und danach im Brutschrank aufbewahrt. Nachdem 60 Minuten lang der Restsauerstoff aus den Medien, Zellen und aus dem Kunststoffmaterial entlang des Konzentrationsgefälles in die Kammer diffundieren konnte, wurde sie erneut 15 Minuten bei 10L/min geflutet. Bei 37°C wurden die Kammern nun im Brutschrank für

die angestrebte Zeit inkubiert. Um bei einigen Zellen auch die Reperfusion zu imitieren, wurden die Platten kurz mit 37°C warmen DMEM gewaschen und dann auf 2ml Maintenance Medium gesetzt und für die angestrebte Zeit weiter kultiviert. Als Kontrollzellen dienten Kardiomyozyten, die für entsprechende Zeit weiterhin in Maintenance Medium kultiviert waren oder in 2ml Kontrollmedium: Ohne Azidose, mit Pyruvat anstelle des Laktat, physiologischen Kaliumgehalt und ohne Glykolyseinhibitoren.

3.3.4 Stimulation der kultivierten Kardiomyozyten während simulierter Ischämie Reperfusion

Um die Auswirkungen verschiedener Stimulanzien auf den Ischämie- und den Ischämie-Reperfusionsschaden zu untersuchen, wurden einige Kardiomyozyten 20 Minuten mit den PI3-Kinase Inhibitoren Wortmannin und LY294002 vorstimuliert. Einige wurden dann mit zusätzlich 60 Minuten mit GDF-15 stimuliert, während andere mit Leukemia-Inhibitory-Factor stimuliert wurden. Diese Agenzien wurden dann auch in das Ischämie- und das Reperfusionsmedium gegeben, um eine kontinuierliche Stimulation der Zellen zu gewährleisten[98].

3.3.5 Schematischer Versuchsaufbau:



3.4 Gewinnung von Zellproteinen aus In Vitro Versuchen

3.4.1 Puffer und Reagenzien

Lysispuffer

50mM	Tris-HCl (PH 7,4)
1mM	Natrium-EDTA
1mM	EGTA
50mM	Natrium-Fluorid
0,5%	NP-40
1%	Triton-X 100

frisch hinzugeben

	1mM	Natrium-Vanadat
	1mM	PMSF
	20µg/ml	Leupeptin
	20µg/ml	Pepstatin
10x Phosphat-Buffered Saline	(PBS)	
	83,33g/L	Na ₂ HPO ₄ (0,58M)
	23,45g/L	NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O (0,17M)
	40g/L	NaCl
	PH 7,4	

3.4.2 Probentnahme

Gesamt Zellprotein:

Zunächst wurden die Zellkulturplatten nach Versuche mit eiskaltem 1xPBS gespült. Dann wurde der Zellrasen mit Hilfe eines Zellschabers und 50-100µl Lysispuffer auf Eis abgeschabt und die resultierende Zellsuspension in einem neuen Eppendorf-Gefäß etwa 30 Minuten auf Eis inkubiert.

Der Lysispuffer führte zu einer Zersetzung von Lipidmembranen, so dass die Zellproteinfraktion freigesetzt wurde, zugleich verhinderte der Zusatz von Proteinaseinhibitoren die Degradierung der Proteine. Nach Ablauf der Lysierungsperiode wurde das Gesamtzellextrakt etwa 5 Minuten bei 13000U/Min zentrifugiert, um nicht-lysiertes Zellmaterial und Zelltrümmer von den Proteinen zu trennen. Die Konzentration der gelösten Proteine wurde nach der Bradford-Methode bestimmt.

Proteine aus dem Zellüberstand:

Um sezernierte Proteine im Zellkulturmedium nachzuweisen, wurde das Zellkulturmedium in ein Ultra-Filter-Röhrchen (AMICON) überführt und anschließend bei 4000rpm 30 Minuten zentrifugiert.

So konnten alle molekularen Bestandteile unterhalb einer Größe von 5kD im Filtrat verworfen werden, während die größeren Zellproteine beträchtlich konzentriert wurden. Das erhaltene Konzentrat wurde mit Sample Buffer gemischt und in der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese im gleichen Volumen eingesetzt.

3.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Fähigkeit des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau, mit sekundären Aminogruppen der Proteine zu reagieren

und einen Farbumschlag zu verursachen. Somit ist die Farbintensität bei einem Absorptionsmaximum bei 595nm direkt proportional zur Protein-Konzentration und kann über eine mit verschiedenen BSA-Konzentrationen erstellte Eichgrade aus den gemessenen Werten ermittelt werden.

Je 1µl der Proteinlösung wird zu 800µl H₂O gegeben und mit 200µl des *Bio-Rad-Reagenz* vermischt. Die Extinktionsmessung bei 595nm erfolgt nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur. Eingesetzt wurden zwischen 20 und 80µg Protein.

3.5 Western-Blotting

3.5.1 Material und Reagenzien

4ml Sample Buffer (2x)

1ml	0,5M TRIS pH 6,8
0,8ml	Glycerol
1,6ml	10% SDS
0,4ml	2-β-Mercaptoethanol
0,2ml	0,1% Bromphenolblau

10X SDS-Laufpuffer

30g/L	TRIS
144g/L	Glycin
10g/L	SDS

Transferpuffer

3,03g/L	TRIS-Base
15g/L	Glycin
20%	Methanol

10x TBS

24,2g/L	TRIS-BASE
80g/L	NaCl
PH 7,6	

TBST-Waschpuffer

1X TBS mit 0,1% Tween 20

3.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, Westernblot und Immunoblotting

3.5.2.1 Hintergrund: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

SDS-Page ist die Standardmethode zur Auftrennung von Proteingemischen.

SDS (Sodiumdodecylsulfat) ist ein polyanionisches Detergenz, welches Proteine, die aus zum Teil unterschiedlich geladenen Aminosäuren bestehen, mit einem Mantel aus negativen Ladungen überdeckt, so dass konstante negative Ladungen pro Masseneinheit entstehen. Diese Ladungsgleichheit ist eine Grundvoraussetzung für die Trennung von unterschiedlich großen Proteinen im elektrischen Feld, deren Wanderungsgeschwindigkeit nun nur noch von der Porengröße des Gels und ihrem Molekulargewicht abhängt.

Zur Probenvorbereitung werden die Proteingemische mit einem Überschuss SDS bei 95°C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen, durch Lösen von Wasserstoffbrückenbindungen und Streckung der Moleküle, aufzubrechen. Mit dem Zusatz reduzierender Thiolverbindungen, wie Mercaptoethanol oder DTT, ist es weiterhin möglich, Disulfidbrücken zwischen Peptidketten, Proteinuntereinheiten und Multimeren (Quartärstruktur) aufzubrechen.

Zunächst werden die Proteingemische in einem weitporigen Sammelgel zu schmalen Banden konzentriert, um dann in einem engporigen Trenngel sich ihrer molaren Masse entsprechend zu trennen.

3.5.2.2 Vorgehen:

a) Vorbereitung der Proteinproben

Die gleiche Masse an Protein (20-80 µg) wurde mit korrespondierenden Mengen an Sample-Buffer versetzt und etwa 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Nach kurzem Abkühlen der Proben im Eisbad und nochmaliger Abzentrifugation wurden die Gele beladen.

b) Giessen der Polyacrylamidgele:

Rezept

1. Trenngel 9%:	4,35ml	H ₂ O
	2,5ml	1,5M TRIS HCL PH 8,8
	200 µl	10X SDS
	3ml	Acrylamid
	50 µl	Ammoniumpersulfat
	5 µl	Tetramethylethyldiamin

2. Trenngel 12%:	3,35ml	H ₂ O
	2,5ml	1,5M TRIS HCL PH 8,8
	200µl	10X SDS
	4ml	Acrylamid
	50µl	Ammoniumpersulfat
	5µl	Tetramethylethyldiamin
3. Sammelgel:	3,05ml	H ₂ O
	1,25ml	0,5M TRIS HCl, PH 6,8
	100µl	10X SDS
	0,66ml	Acrylamid
	25µl	Ammoniumpersulfat
	5µl	Tetramethylethyldiamin

3.5.3 Giessen und Beladen der Gele

Zunächst wurde das Trenngel gewünschter Konzentration gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um einen gleichmäßigen Flüssigkeitsspiegel, ohne Luftblässchen, zu erzielen. Nach vollständiger Polymerisierung wurde das Isopropanol abgesaugt und ein Sammelgel mitsamt Slot-Kamm überschichtet.

Nach Polymerisation wurde das Gel in die Laufapparatur gespannt und die Proteinproben in 1X SDS Laufpuffer in die Slots geladen. Die Anfangsstromstärke betrug 35V und wurde nach Erreichen der Trenngelschicht auf 75V erhöht

3.5.4 Der Proteintransfer

3.5.4.1 Hintergrund:

Beim Western-Blot-Transfer werden in einer SDS-PAGE aufgetrennte Proteine aus dem Polyacrylamidgel über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Bei diesem Vorgang wird das an den Proteinen angelagerte SDS entfernt. Daher können die Proteine renaturieren und teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen, nicht aber ihre Quartärstruktur. Die Proteine können dadurch später von spezifischen Antikörpern erkannt werden. Die Proteine werden durch hydrophobe Wechselwirkungen dauerhaft an die Nitrocellulosemembran gebunden, während niedermolekulare Verbindungen sie durchwandern.

3.5.4.2 Vorgehen

Das Polyacrylamidgel, zwei Whatmann-Filterpapiere, Schaumstoff und die Nitrocellulosemembran wurden zunächst in Transferpuffer equilibriert. Auf die Kathodenplatte wurde eine Lage Schaumstoff, darauf ein getränktes Filterpapier und das zuvor vom Sammelgel befreite Trenngel, sowie die Membran, gelegt. Auf die Membran wurde nacheinander ein Filterpapier und eine Lage Schaumstoff platziert, den Abschluss bildete die Anodenplatte. Bei dem gesamten Vorgang wurden entstehende Luftblasen stets entfernt. Der Transfer erfolgte bei konstanten 350mA für 60 Minuten.

3.5.4.3 Ponceau-S-Färbung

Um zu kontrollieren, ob der Transfer in akzeptabler Qualität erfolgte und die Proteinmengen gleichmäßig aufgetragen waren wurde die Nitrozellulosemembran mit Ponceau S Lösung (0,2 % (w/v) Ponceau S, 3 % TCA (v/w)) gefärbt und anschließend mit TBST wieder entfärbt.

3.5.5 Immunoblotting

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Anti PTGF-beta (Santa Cruz)	1:500	Anti-Goat HRP (Dianova)	1:5000
Anti MIC-1	1:1000	Anti-Rabbit HRP(Amersham)	1:2000
Anti GDF-15 (R&D)	1:1000	Anti-Goat HRP	1:5000
Anti-AKT (Cell Signalling)	1:1000	Anti-Rabbit HRP(Amersham)	1:2000
Anti-Phospho-AKT Ser 473	1:1000	Anti-Rabbit HRP(Amersham)	1:2000
Anti-Bad (Cell Signalling)	1:1000	Anti-Rabbit HRP(Amersham)	1:2000
Anti-Phospho-Bad Ser136	1:500	Anti-Rabbit HRP(Amersham)	1:2000
Anti-alpha-Actinin(SIGMA)	1:1000	Anti-Mouse HRP(Amersham)	1:2000

Verwendet in 10 ml Blotting Lösung

3.5.5.1 Lösungen

ECL 1

100mM	TRIS-HCL, PH8,8
2,5mM	Luminol Fluka
0,4mM	Kumarin Säure (SIGMA)
Ad 50ml	Wasser

ECL 2

100mM	TRIS-HCL, PH8,8
0,015%	Wasserstoffperoxid
ad 50ml	Wasser

Blotting Lösung

1X TBS mit 0,1% Tween und 5% Milchpulver oder BSA

3.5.5.2 Vorgehen

Um freie Bindungsstellen der Membran abzusättigen und so erst eine spezifische Detektion einzelner Proteine durch einen Antikörper zu ermöglichen, musste die Membran mit einem Protein abgesättigt werden, dass möglichst nicht vom Antikörper selbst erkannt wurde. Meist wird hier eine Blocking Lösung aus TBST und Milchpulver oder Bovines Serum Albumin (BSA) verwendet.

Spezifische Proteine und Proteinzustände wurden mit unterschiedlichen Primärantikörpern nachgewiesen (siehe Tabelle). Hierfür wurden die Membranen bei 4°C über Nacht, bei vorsichtigem Schütteln, mit dem Primärantikörper in geeigneter Verdünnung in TBST inkubiert. Dann erfolgte eine einstündige Inkubation mit einem passenden HRP-konjugiertem Sekundärantikörper in entsprechender Verdünnung 60 Minuten bei Raumtemperatur. Der mit Peroxidase markierte sekundäre Antikörper katalysiert die Oxidation von Luminol und löst damit eine Chemilumineszenz aus. Zur Visualisierung wurde die Membran dann 60 Sekunden in ECL-Entwicklerlösung, bestehend aus je 3ml ECL 1 und ECL 2 unter Rotlicht geschwenkt und anschließend in Plastikfolie luftblasenfrei eingebettet und das Signal auf einem Röntgenfilm (Kodak X-Omat) sichtbar gemacht.

3.6 Evaluation des Zelltodes

3.6.1 Nekrotischer Zelltod

Ermittlung von Plasmamembranschäden über den Nachweis zytoplasmatischer Proteine im Zellkulturmedium mittel eines **Laktat-Dehydrogenase Assay**

3.6.1.1 Testprinzip

Die Laktat-Dehydrogenase katalysiert die $\text{NAD}^+/\text{NADH}/\text{H}^+$ abhängigen Reaktionen von Laktat zu Pyruvat und umgekehrt. Die Reduktion und Oxidation des Kofaktors ist direkt proportional zur umgesetzten Substratmenge, und sofern diese konstant gehalten wird, von der Enzymaktivität. Ein Im Cytotoxicity-Detection-KIT enthaltener Katalyst (Diaphorase) transferiert nun H/H^+ vom NAD zu INT(2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium Chlorid), einem gelblichen Salz dass dadurch zum rotgefärbten Formazan oxidiert wird und spektralphotometrisch bestimmt werden kann.

3.6.1.2 Material/Reagenzien

Cytotoxicity Detection KIT (ROCHE)

Lysismedium: 2% Triton X 100 im Maintenancemedium

Backgroundkontrolle: Maintenance-/ Ischämiemedium

STOP Solution: 1 Molare Salzsäure

96 well ELISA Platte (NUNC)

ELISA Reader (Lambda Reader)

Humanes GDF-15 (R&D)

Rekombinantes Ratten LIF (CHEMICON)

Wortmannin (Cell signalling)

LY294002 (SIGMA)

3.6.1.3 Vorgehen

Nach Versuchende wurde als Positivkontrolle 200µl Kulturmedium von Kardiomyozyten verwendet, deren Membranen mit 1:1 Vol Lysismedium zuvor komplett lysiert wurden. Damit erhielt man einen Anhalt über die maximale LDH

Aktivität pro Zellkulturplatte. Zum anderen wurden unverzüglich 100µl Kulturmedium abpipettiert, jeweils mit entsprechendem Medium auf 200µl (gleiches Volumen wie die Positivkontrolle) aufgefüllt, und in die ELISA Platte gegeben. Dann wurden 100µl eines Katalyst/Farbstoffgemisches hinzu gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert. Schlussendlich wurde die Reaktion durch Zugabe von 50µl Stop-Solution beendet. Die Absorptionsmessungen erfolgten bei 490nm gegen 620nm als Referenzwellenlänge im ELISA-Reader. So konnten nun Kardiomyozyten unter mit verschiedenen Kulturbedingungen und Stimulationen, gegen Medium als Hintergrund, verglichen werden.

3.6.2 Apoptotischer Zelltod

Messung Histon-assoziiierter-Oligonukleosomen mittels eines Cell death Detection ELISAS^{plus} (ROCHE)

3.6.2.1 Hintergründe

Mehrere Stunden bevor es auch während des apoptotischen Zelltodes zu Zusammenbruch der Plasmamembran kommt, reichern sich im Zytoplasma Mono- und Oligonukleosomen, bestehend aus Chromatinfragmenten an. Diese entstehen, wenn während der apoptotischen Kaskade Calcium und Magnesium abhängige Endonukleasen DNA-Stränge an spezifischen internukleosomalen Linker-Regionen spalten.

Die DNA in den Nukleosomen selbst ist eng mit den so genannten HISTON-Proteinen H2A H2B H3 und H4 komplexiert und so vor den Endonukleasen geschützt. Diese zytoplasmatischen Mono- und Oligonukleosomen, reich an Histonen, sind charakteristisch für den apoptotischen Zelltod und können in einen kommerziellen Sandwich-ELISA detektiert werden.

3.6.2.2 Testprinzip

Der ELISA macht sich zum einen die überaus feste Biotin-Streptavidin Verbindung und zum anderen die Peroxidase katalysierte Farbreaktion von ABTS zunutze. Eine mit Streptavidin beschichtete ELISA Platte wird mit Zell-Lysat und einem monoklalen Antikörpergemisch aus einem Biotin-konjugierten Anti-Histon Antikörper (welcher die Nukleosomen an die Streptavidin beschichtete Platte bindet)

und einem Peroxidase gekoppelten Anti-DNA Antikörper (der den Nachweis der Nukleosomen über eine ABTS Farbreaktion ermöglicht) inkubiert.

3.6.2.3 Material und Reagenzien

Cell death detection ELISA^{plus} (ROCHE)

ELISA Reader

Humanes GDF-15 (R&D)

Rekombinantes Ratten LIF (CHEMICON)

Wortmannin (Cell signalling)

LY294002 (SIGMA)

3.6.2.4 Vorgehen

Nach Versuchsabschluss wurden die Kardiomyozyten in 200µl Lysispuffer aufgenommen und 30 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Nach Abzentrifugation der Zell- und Zellkerntrümmer (200g, 10 Minuten), wurden 10µl Überstand mit 10µl Inkubationspuffer gemischt und zusammen mit 80µl des angesetzten Immunoreagenz (beide Antikörper in Inkubationspuffer) in der Streptavidin-beschichteten Platte 2h bei Raumtemperatur auf einem Rüttler inkubiert.

Nach drei Waschschritten mit je 250µl Inkubationspuffer wurden pro Well 100µl ABTS Lösung hinzu gegeben. Nach 15 minütiger Inkubation wurde das entstandene Farbprodukt im ELISA Reader bei 405nm gegen ABTS-Lösung als Leerwert gemessen.

3.6.3 Messung apoptotischer Kerne mittels TUNEL *in situ* Färbung

3.6.3.1 Hintergrund:

Die während der Apoptose im Zellkern entstehenden DNA-Strangbrüche und die resultierenden Mono- und Oligonukleosomen können über eine immunhistochemische Markierung mit speziellen Methoden auch *in Situ* erkannt und quantifiziert werden.

Bei dieser Methode koppelt eine Terminale Deoxynukleotidyl Transferase mehrere Digoxigenin-markierte dUTP an die freien 3OH' Enden der DNA Fragmente[99]. Die

dabei entstehenden Heteropolymere könne dann über fluoreszenzmarkierte Anti-Digoxigenin Antikörper im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Bei der Auswertung ist stets darauf zu achten, das TUNEL positive Kerne, wie auch die gesamte apoptotische Zelle, verschiedene morphologische Stadien durchlaufen. So sind apoptotische Zellen, ebenso wie auch die Kerne, anfangs noch groß mit lediglich sichtbarer Chromatin-Margination, dann werden sie zunehmend fragmentiert und schließlich zu so genannten *apoptotic bodies* kondensiert. Insofern kann eine Kernfärbung mit fluoreszierendem Hoechst-Farbstoff die typische Kernmorphologie sichtbar machen und das TUNEL Ergebnis validieren.

3.6.3.2 Material/Reagenzien

4% Paraformaldehyd
Ethanol/Acetat 2:1
1X PBS
Hoechst dye
Vectastain-Mounting Medium
Glas Deckgläschen
Apoptag in situ Apoptosis Detection Kit
Feuchtkammer
Fluoreszenzmikroskop

3.6.3.3 Vorgehen

Nach Absaugen des Zellkulturmediums wurden die Kardiomyozyten zunächst gewaschen und dann 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach gründlichem Trocknen und 3x 5 Minuten Waschen in PBS, wurden die Zellen mit eiskaltem Ethanol/Acetat bei -20°C permeabilisiert und erneut 3x5 Minuten in PBS gewaschen. Nun wurde mit einem Permanentmarker ein quadratisches Areal der Größe 1,5cm x 1,5cm markiert.

Nach Abklopfen der überschüssigen Lösungen wurde das Areal mit 75µl Equilibrierungspuffer mindestens 10 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Puffer wurde anschließend vorsichtig abgesaugt, 55µl der angesetzten TdT-Enzymlösung hinzupipettiert und mit einer zugeschnittenen Folie abgedeckt, damit sich ein gleichmäßiger Flüssigkeitsfilm bilden konnte. In einer Feuchtkammer wurden die Zellen so für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Nach einer 10minütigen Waschprozedur mit dem enthaltenen Wasch-/Stopp-Puffer, wurde erneut die überschüssige Flüssigkeit entfernt und auf das Areal 65µl des FITC-konjugierten Anti-Digoxigenin Antikörpers gegeben und mit Folie abgedeckt.

In der lichtgeschützten Feuchtkammer wurden die Zellen so für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach 3x5 Minuten lichtgeschütztem Waschen mit PBS, wurden die Zellen mit Hoechst Farbstoff in PBS für 1 Minute bei Raumtemperatur gegengefärbt, mit Wasser gewaschen und mit Vectastain Mounting-Medium unter einem Deckgläschen eingebettet.

Die geblindete Auszählung von 10 Zufällig gewählten Gesichtsfeldern erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Es wurden TUNEL-positive Kerne und Hoechst positive Kerne ausgezählt.

3.6.4 Messung der Phosphatidylserin-Exposition an der Außenseite der Zellmembran durch ANNEXIN V-Labeling und FACS Analyse

3.6.4.1 Hintergrund:

Eines der frühesten morphologischen Zellveränderungen während der Apoptose ist der Verlust des asymmetrischen Aufbaus der Plasmamembran. Unter physiologischen Bedingungen sind gewisse Membrankomponenten, wie Phosphatidylserin nur an der Innenseite der Lipiddoppelschicht exponiert. Durch apoptotische Stimuli wird dieses Molekül nun an die Außenseite der Lipiddoppelschicht transloziert und der Außenwelt präsentiert. Annexin V ist ein körpereigenes 30-35kDa großes Protein, welche Calcium-abhängig solche Moleküle bindet und die apoptotische Zelle somit für professionelle Fresszellen sichtbar macht[30]. Über die Konjugation des Annexin V mit Fluoreszenzfarbstoffen wie FITC können solche Zellen auch im FACS gezählt werden. Da die Exposition von Phosphatidylserin jedoch nur in der Frühphase der Apoptose hierfür spezifisch ist, während auch in der Spätphase der Apoptose und in der Nekrose Phosphatidylserin durch Annexin gebunden wird, verwendet man zusätzlich Propidiumiodid. Propidiumiodid zeichnet sich durch die Fähigkeit aus DNA zu binden und dann zu fluoreszieren. Dies setzt jedoch eine Durchlässigkeit der Zellmembran, wie sie in der späten Apoptose und in der Nekrose, nicht jedoch in der frühen Apoptose

charakteristisch ist, voraus. Somit kann man die Propidiumiod-Annexin V-positiven (späte Apoptose, Nekrose) von den Propidiumiod-negativen aber Annexin V positiven Zellen (frühe Apoptose) unterscheiden.

3.6.4.2 Testprinzip:

FACS steht für *fluorescence activated cell sorting* und beruht auf das Prinzip der Durchflusszytometrie. Diese ist die automatisierte Analyse der optischen Eigenschaften einzelner Zellen im Durchfluss. Im Durchflusszytometer werden die Zellen wie auf einer Perlenschnur einzeln aneinandergereiht durch einen Laserstrahl geführt und so zur Eigenfluoreszenz angeregt. Das resultierende Fluoreszenz- und Streulicht wird von verschiedenen Lichtdetektoren aufgefangen und nach Intensität und Farbe vom Computer registriert. So wird für jede einzelne gemessene Zelle eine charakteristische Kombination von optischen Eigenschaften aufgezeichnet.

Im Genaueren basiert die Methode auf eine Antigen-Antikörper-Reaktion, welche mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt wird. Das Flüssigkeitssystem führt die zu analysierende Zelle aus dem Probenröhrchen durch den Laserstrahl. Dazu wird der Probenstrahl von einem Hüllstrom zu einem sehr dünnen Flüssigkeitsfaden auseinander gezogen. Das von der Zelle in Richtung des Laserstrahls gestreute Licht wird vom Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*), das Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*) und verschiedene Fluoreszenzfarben rechtwinklig zum Laserstrahl aufgenommen und auf die verschiedenen Detektoren gelenkt.

Jede der aufgezeichneten optischen Eigenschaften (Streu- und Fluoreszenzlicht) steht für eine bestimmte Charakteristik der gemessenen Zelle. Das Vorwärtsstreulicht, d.h. das in Richtung des Laserstrahls gestreute Licht, korreliert mit der Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (in rechtem Winkel zum Laserstrahl gestreutes Licht) mit der internen Struktur der Zelle.

Bei Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes wird der Laserstrahl zusätzlich auf ein höheres Energieniveau gehoben und fällt unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf sein Ursprungsniveau zurück. Die ermittelte Photonenmenge, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle und erlaubt somit eine Aussage über z.B. die Expression von Oberflächenmolekülen.

3.6.4.3 Material/ Reagenzien

Eisgekühltes 1X PBS

Steriles 1X PBS versetzt mit 2% FCS

DMEM versetzt mit 10% PBS

0,5% Trypsin EDTA in Maintenancemedium

Annexin-V-Fitc-Apoptosis-Detection kit (BD Pharmingen)

FACS CALIBUR (Beckton Dickinson)

Mikroskop

Eisbad

Vorgehen:

3.6.4.4 Trypsinisierung

Zu den indizierten Zeitpunkten wurden die Kardiomyozyten zunächst mit eisgekühltem PBS gewaschen. Dann wurde in die Kulturschale für 60 Sekunden 0,5ml Trypsin EDTA gegeben, um die Zellen von ihrer Gelatine Unterlage abzulösen. Dies wurde durch ein Mikroskop kontrolliert. Nun wurden die abgelösten Zellen schnellstmöglich in DMEM 15% FCS überführt, um das Trypsin zu neutralisieren, da es als Protease auch die Zellmembranen angreift und die Zelle letztendlich tötet. Nach Abzentrifugation des Zellpellets bei 700rpm für 5 Minuten und zwei weiteren Waschschritten mit 1X PBS, wurde das Zellpellet schließlich mit 1ml PBS+2%FCS resuspendiert und auf Eis gelagert.

3.6.4.5 Annexin V Labeling

Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert und die Zellen nun in 1X Binding Puffer resuspendiert. Etwa 100µl mit rund 10^5 Kardiomyozyten wurden in ein 5ml FACS-Tube geladen und 5µl Annexin V FITC hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 15 Minuten unter Lichtschutz bei Raumtemperatur wurden 5µl Propidiumiodid und 400µl Binding Puffer ergänzt und das Ergebnis im FACS ausgewertet.

3.7 Versuche zur GDF-15 Expression *in vivo* in der Maus

Um den Ort und die Umstände der GDF-15 Expression im kardiovaskulären Kontext *in vivo* zu untersuchen, wurde das im Folgenden beschriebene murine Operationsmodell genutzt.

3.7.1 Chronisches Infarktmodell und Ischämie / Reperusionsmodell¹

⁽¹⁾Die im Folgenden unter 3.7.1-3.7.3 aufgeführten Tierexperimente wurden durch den Tierarzt der Arbeitsgruppe bzw. durch den dazu befugten Betreuer im Rahmen eines genehmigten Tierversuchsantrags durchgeführt.)

Als Versuchstiere wurden ausschließlich männliche C57 Black 6 Mäuse verwendet, deren Alter mehr als 8 Wochen betrug.

Die Tiere wurden mit intraperitonealer Gabe von Ketamin (100mg/kg Körpergewicht) und Xylacin (4mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Nach Einsetzen der Narkose folgte die perorale Intubation mit anschließender kontrollierter Beatmung (Harvard Respirator 683, Holliston, MA, USA), während derer sowohl Narkose, wie auch die Anästhesie mittels Isofluraninhalation (1-2%) aufrechterhalten wurde. Während des Eingriffes wird eine Auskühlung der Maus durch einen beheizten Operationstisch verhindert.

Nach vorsichtiger Fixierung der Tiere, Rasur und Desinfektion wird eine linksseitige Thorakotomie im 5. Interkostalraum durchgeführt. Nach Perikarderöffnung wird der Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie, der vor allem die linksventrikuläre Vorderwand versorgt, mit einem 6-0 Prolene Faden (Ethicon, Norderstedt, D) unterbunden. Die ischämiebedingte Abblassung des versorgten Myokardbezirks, die Vorwölbung und Abnahme der Kontraktilität dieser Region, wurde zur Kontrolle und als erste Schätzung der Infarktgröße herangezogen. Im chronischen Infarktmodell wurde die Ligatur belassen und die Thorakotomie bereits wieder verschlossen.

In der Ischämie-Reperfusion brachte man, um eine Wiedereröffnung der Koronararterie zu ermöglichen, einen sterilen Abstandshalter zwischen Faden und Gefäß. Dieses Vorgehen ermöglicht erstens, das Gefäß durch Entfernung des Abstandshalters schonender wiederzueröffnen und zweitens, das Gefäß vor Verletzungen zu schützen, die einen späteren Blutfluss stören könnte. Nach einer

Ischämiezeit von 60 Minuten wurde der Abstandshalter entfernt und der Operationsfaden vorsichtig gezogen. Die Qualität Reperfusion des Myokardareals wurde im Mikroskop durch die Farbänderung bewertet und kontrolliert.

Post-OP wurden Rippen und Muskulatur adaptiert und die Haut durch mehrere Einzelkopfnähten verschlossen. Nach Desinfektion der Operationswunde wurde anstelle des Isofluran mit reinem Sauerstoff weiterbeatmet. Das Einsetzen der Spontanatmung wurde durch Beobachten der der Atemhilfsmuskulatur bzw. temporären Lösen des Tubus vom Beatmungsgerät kontrolliert. Bei einsetzender Spontanatmung, wurde die Maus endgültig vom Beatmungsgerät getrennt. Die Extubation erfolgte nach Rückkehr der Reflexe, und die Maus wurde bis zum vollständigen Erwachen in einem 28°C temperierten Inkubator unter kontinuierlicher Beobachtung und einer postoperativen Analgesie durch Novalgin-Zusatz im Trinkwasser verwahrt.

Um die Auswirkungen der myokardialen Ischämie, bzw. Ischämie-Reperfusion zu untersuchen wurden jeweils gleiche Anzahlen an Mäusen gleichen Alters und Geschlechts scheinoperiert (Sham-OP). Dies bedeutet, dass an den Tieren exakt die gleiche Operation, inklusive Perikarderöffnung, vorgenommen wurde, ohne jedoch den Ramus interventricularis anterior zu unterbinden. Diese Prozedur schließt weitestgehend eine Beeinflussung und Verfälschung der Ergebnisse durch Operations- und vor allem Narkosebedingungen aus.

3.7.2 Gewebeentnahme

Nach Ablauf der entsprechenden Zeitperioden wurden die Tiere getötet und der Thorax wiedereröffnet. Nach Entnahme des gesamten Herzens wurden unter einem Mikroskop beide Atriae samt Gefäßstümpfen, Nahtmaterial und Perikardresten, sowie der Ventriculus dexter gründlich entfernt. Um Degradierung von RNA und Proteinen zu verzögern wurden diese und auch die weiteren Vorgänge auf einem Eisblock und in eisgekühlter 0,9% NaCl durchgeführt.

Um in jedem Einzeltier infarziertes Gewebe mit nicht-infarziertem Gewebe zu vergleichen, wurde ein kleines Stück Myokard distal der Ligatur entnommen (Infarktgewebe oder in der Ischämie-Reperfusion sog. Area-at-Risk). Zum Vergleich diente ein Myokardareal das möglichst nicht vom Ramus interventricularis anterior

versorgt wird (dorsaler Herzbasis-naher Teil des Septum interventriculare, so genanntes „*Remote-Myokard*“).

Bei Sham operierten Tieren wurden korrespondierende Myokardteil entnommen und unverzüglich in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Für spätere immunhistologische Untersuchungen wurde ein infarzierter oder vergleichbarer Sham-operierter Myokardquerschnitt in OCT auf einer Korkunterlage eingebettet und ebenfalls in Stickstoff tiefgefroren.

3.7.3 Evans-Blue/TTC-Färbung zur Bestimmung der Infarktgröße

24 Stunden nach der I/R-Operation wurden die Testtiere erneut narkotisiert, intubiert und beatmet. Nach der Brustkorb- und Perikarderöffnung wurde die LAD an der gleichen Stelle wie am vorigen Tag unterbunden. Anschließend wurde 1ml 2%-iges Evans-Blue in NaCl (*Sigma*) in den rechten Ventrikel gespritzt und durch das schlagende Herz in die offenen Koronarien und das versorgte Myokard gepumpt. Dadurch wurde das nichtversorgte Myokard blau gefärbt, während das von der Ischämie betroffene Myokardareal (AaR) farblos blieb.

Nach ausreichender Diffusion des Evans-Blue-Farbstoffs in das Herzgewebe wurde das Herz komplett entnommen und in eiskaltem PBS gespült, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Sämtliche Gefäße, die Vorhöfe und der rechte Ventrikel wurden anschließend abgetrennt. Der verbleibende linke Ventrikel wurde in 5%-iger Agarose in PBS (*Cambrex Bio Sciences*) eingebettet und zum Härten im Kühlschrank abgekühlt. Der harte Agaroseblock wurde dann in 4-5 Scheiben geschnitten, die 10 Minuten lang in 2%-igem TTC (2,3,5-Triphenyltetrazolium Chlorid, *Sigma*) in PBS bei 37°C inkubiert wurden. Da TTC vitale Mitochondrien färbt, konnte durch diesen Inkubationsschritt das vitale Myokard in der AaR gefärbt werden. Dabei blieb der Infarktbereich (abgestorbene Kardiomyozyten) farblos. Abschließend wurden die Herzscheiben in 3,5-3,7%-igem Formaldehyd gelagert, gewogen und mittels Lichtmikroskopie ausgewertet. Dazu wurden die Vorder- und Rückseite jeder Herzscheibe fotografiert, und sowohl das blaue, das rote als auch das farblose Areal wurden ausgemessen. Mit Hilfe der gemessenen Gewichte der einzelnen Herzscheiben wurden die Anteile von gesundem Myokard (blau), AaR (farblos+rot) und Infarkt (farblos) ausgerechnet.

3.7.4 Entwässerung und Paraffinisierung Formalin fixierter Gewebe

3.7.4.1 Material

Ethanol (25%, 50%, 75%, 90%, 99%)

Isopropanol, *Merck*

Xylol (Roticlear), *Roth*

Paraffin, *Merck*

Reagenzgläser, *Roth*

Einbettkassetten, *Roth*

Einbettmetallmulden, *Sakura (Tissue Tek)*

Objektträger, *Knittel-Gläser*

Kryotom CM 1900, *Leica*

3.7.4.2 Durchführung

Die Formalin fixierten Herzscheiben, die in der Evans-Blue/TTC-Färbung untersucht worden sind, wurden in einem Reagenzglas zunächst in H₂O_{dd} zwei Mal für 15 Minuten inkubiert. Die Entwässerung der Gewebsscheiben erfolgte durch eine Behandlung mit Ethanol in steigenden Konzentrationen. Hierfür wurde 25%-, 50%-, 75%-, 90%- und 99%-iges Ethanol in jeweils zwei 15-minütigen Inkubationsschritten verwendet. Lediglich die Inkubation in der höchsten Ethanolkonzentration wurde dreifach ausgeführt. Eine Unterbrechung über Nacht erfolgte nach dem letzten Inkubationsschritt im 75%-igen Ethanol. Im Anschluss an der Inkubation im 99%-igen Ethanol wurde eine dreifache Behandlung mit 100%-igem Isopropanol für jeweils 15 Minuten durchgeführt.

Um die Aufnahme des Paraffins in das Gewebe zu verbessern, folgte eine dreifache Inkubation in Xylol für jeweils 15 Minuten. Anschließend folgten zwei Inkubationsschritte im geschmolzenen Paraffin jeweils für 3 Stunden bei 70°C.

Danach wurden die Herzscheiben in frischem Paraffin über Nacht bei 70°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Paraffin noch mal morgens gewechselt. Am Abend wurden Metallmulden mit flüssigem Paraffin gefüllt. In jeder Mulde wurde eine Herzscheibe eingebettet. Eine Plastikeinbettkassette wurde zum Schluss an der Oberfläche des Paraffins adhäriert, und der Block zum Trocknen über Nacht bei RT stehengelassen.

Am folgenden Tag wurden die mittlerweile harten Paraffinblöcke eine Stunde bei -20°C eingefroren. Danach konnten die Metallmulden leicht von den Paraffinblöcken abgelöst werden. Die Plastikeinbettkassetten klebten an dem Paraffinblock, wo die Herzscheibe eingebettet war. Die Blöcke konnten entweder bei 4°C oder bei RT gelagert werden, wobei es sich empfiehlt, die Blöcke kurz vor dem Schneiden bei -20°C zu kühlen, damit das Paraffin beim Schneiden eine optimale Härte besaß.

Das Schneiden erfolgte am Kryotom CM 1900 (*Leica*). Die Schnitte wurden zunächst in einem 40°C Wasserbad relaxiert, bevor sie anschließend mit einem Objektträger aufgenommen und über Nacht auf einer 40°C warmen Platte getrocknet wurden.

3.7.4.3 Vorbereitung von OCT-Gefrierschnitten

In OCT eingebettete und in flüssigem Stickstoff eingefrorene Herzgewebsstücke wurden am Kryotom 2050 (*Leica*) in parallele, 6µm dicke Schnitte geschnitten und auf Objektträgern aufgenommen. Angefertigte Schnitte wurden bei -80°C gelagert.

3.7.5 HE-Färbung von Herzgefrierschnitten

Die Hämatoxylin/Eosinfärbung (HE-Färbung) ist eine einfache histologische Methode, um Zellkerne und zytoplasmatisches Material in Gewebsgefrierschnitten sichtbar zu machen.

OCT-Gefrierschnitte wurden nach dem Auftauen 5min in 95%-igem Ethanol fixiert und an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte in die Hämatoxylinlösung (Hämatoxylin nach Weigert) für eine Minute inkubiert und mehrmals mit Leitungswasser gespült. Danach wurden die Schnitte für eine weitere Minute in einer 1%-igen wässrigen Eosin-Lösung (mit Essigsäure angesäuert) inkubiert und ebenfalls in Leitungswasser gewaschen.

Danach wurde die Färbung mikroskopisch kontrolliert. Bei unzureichender Färbung wurden die Schnitte entsprechend nachgefärbt. Abschließend wurden die Schnitte in flüssigem Einbettmedium (Glycergel) eingebettet und mit einem Deckglas versehen.

3.8 TUNEL-Färbung von Paraffinschnitten zum Nachweis von Apoptose

3.8.1 Material

ApopTag® Fluorescein *In Situ* Apoptosis Detection Kit, *Chemicon International*

Xylol, *Roth*

Ethanol (50%, 70%, 95%, 100%)

1x PBS

(Proteinase K (Stocklösung: 20g/l), *Merck*

DNase I – Typ IV (Stocklösung: 5000U/ml in 5mM CaCl₂), *Sigma*

DNase-Puffer

20mM Tris-HCl, pH 8

10mM MgCl₂

Hoechst 33258, *Sigma*

Fluoreszenz Einbettmedium, *Dako Cytomation*

Glasfärbeküvetten

Feuchte Kammer

Deckgläschen, *Menzel-Gläser*

Fluoreszenzmikroskop (Leica DM 4000 B), *Leica*

3.8.2 Durchführung

Zunächst wurden die Paraffinschnitte durch eine 20-minütige Inkubation in Xylol, eine 10-minütige Inkubation in 100%-igem Ethanol und jeweils 3-minütige Inkubationen in 95%-, 70%- und 50%-igem Ethanol entparaffinisiert. Anschließend wurden die Schnitte in PBS 5 Minuten lang gewaschen.

Danach folgte ein Vorbehandlungsschritt der Präparate mit Proteinase K, um das Gewebe für die späte Antikörperbindung zu permeabilisieren. Dazu wurden 70µl der Stocklösung (20g/l) in 70ml PBS gelöst, um eine Endkonzentration von 20µg/ml zu erreichen. Die Proteinase K-Vorbehandlung erfolgte für 20 Minuten bei Raumtemperatur.

Anschließend erfolgten zwei Waschschrte in H₂O für jeweils zwei Minuten. Danach wurden alle Schnitte in PBS aufbewahrt, während der DNase-Verdau mit der Positivkontrolle durchgeführt wurde. Dazu wurde die Positivkontrolle für 5 Minuten im DNase-Puffer äquilibriert. Der DNase I-Stock wurde 1:1 mit dem DNase-Puffer

verdünnt und 10 Minuten lang auf den Schnitt gegeben. Anschließend erfolgten zwei Waschschriffe in H₂O für zwei Minuten und ein Waschschriff in PBS für 5 Minuten.

Nach dem DNase-Verdau der Positivkontrolle wurden alle Schnitte im Equilibration-Buffer (Kit) für mindestens 10 Sekunden inkubiert und dann wurde auf jeden Schnitt 11µl der TdT-Enzyme Working Solution pipettiert (33µl TdT-Enzym + 77µl Reaction Buffer (*Kit*)). Die Schnitte wurden anschließend mit einer Folie bedeckt, um die Verdunstung der Inkubationslösung zu verhindern, und in die Feuchtkammer gestellt. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37°C.

Anschließend wurden die Schnitte zehn Minuten lang in der Stop Solution (Kit) in der Glasfärbeküvette inkubiert. Hierfür wurden 2µl der Stocklösung auf 68ml PBS verdünnt.

Nach drei einminütigen Waschschriffen in PBS wurden die Schnitte mit dem FITC-markierten Anti-Digoxigenin-Antikörper inkubiert (47µl Anti-Digoxigenin-Antikörper + 53µl *Blocking* Solution (*Kit*)). Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei RT für 45 Minuten.

Nach 4 Waschschriffen in PBS wurden die Schnitte eine Minute lang in der Hoechst/PBS-Lösung (Hoechstkonzentration: 2µl/ml) lichtgeschützt gegengefärbt, um alle Kerne zu markieren.

Anschließend wurden die Schnitte kurz in H₂O gewaschen und zum Schluss im Fluoreszenz-Einbettmedium unter einem Deckgläschen blasenfrei eingebettet. Die Schnitte wurden unter Lichtschutz kühl gelagert.

Die geblindete Auszählung von 8 zufällig gewählten Gesichtsfeldern im Infarktbereich¹ bei einer 20-fachen Vergrößerung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Software: QWin V3, *Leica*). Es wurden TUNEL-positive Kerne bei blauem Licht und Hoechst positive Kerne bei grauem Licht ausgezählt.

3.9 Isolation von gesamt RNS aus Myokardgewebe

3.9.1 Hintergrund/Prinzip

Ribonukleinsäuren sind in ihrer Stabilität durch ubiquitär vorkommende Abbauenzyme (RNAsen) gefährdet.

Um den Abbau der RNS durch dies Enzym zu unterbinden, werden alle Glaswaren bei 200°C gebacken, stets Handschuhe getragen und auf Eis gearbeitet. Des Weiteren bedient man sich der Hilfe von RNase-Inhibitoren, wie zum Beispiel DEPC (Diethylpyrocarbonat), welches kovalente Bindungen mit Histidinresten des Enzyms eingeht und somit deren Aktivität hemmt. Um nach dem Zellaufschluss interne RNase-Aktivität zu unterdrücken, setzt man unterschiedliche Methoden der Proteindenaturierung ein. Eine klassische Methode nutzt die denaturierende Wirkung von Guanidiniumisothiocyanat 1,2 (GITC), einem chaotropen Salz, aus. Dadurch werden Proteine entfaltet und inaktiviert, sie bleiben aber gelöst.

Bei der Trizol (Mischung aus GTIC und Phenol)/Chloroform Methode wird nun die RNS vom Zellrest isoliert. Die Proteine und DNS denaturieren und während der hydrophobe Anteil in der Phenolphase hängen bleibt, ragt der geladene, hydrophile Teil in das Chloroform. So bildet sich die Interphase. Proteine mit weitestgehend hydrophober Struktur befinden sich überwiegend in der organischen Phase. Die in der wässrigen Phase gelöste RNS wird schließlich durch Wasserentzug mit Isopropanolzugabe gefällt.

3.9.2 Geräte, Materialien, Reagenzien:

TRIZOL Reagenz (Peggold TRIFAS)
Isopropanol
Chloroform
DEPC-Wasser
70% Ethanol DEPC Wasser
Zentrifuge
Eisbad

3.9.3 Vorgehen

Die bei -80°C tiefgefrorenen Gewebeteile, wurden zunächst in flüssigem Stickstoff zwischengelagert. Diese wurden dann in 1ml Trizol mit dem Gewebe-Hechsler zerkleinert und etwa 10 Minuten auf Eis lysiert. Nach Scherung der DNS durch mehrmaliges auf- und

niederpipettieren und Zugabe von 500µl Chloroform wurde gründlich gemischt. Nach 2 minütiger Inkubation auf Eis wurde bei 13000U/min 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

Nach der Phasentrennung wurde die obere wässrige Phase abgenommen und in ein neues steriles Eppendorfgefäß gegeben. Nach Zugabe von 0,5 Vol. Isopropanol wurde die RNS bei -20°C über Nacht gefällt.

Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 13000 U/Minuten wurde der Überstand dekantiert und das RNS Pellet zweimal mit 700µl 70% DEPC-Ethanol gewaschen. Anschließend wurde auch der Alkohol dekantiert und das Pellet in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Nachdem die RNS in 14µl DEPC-Wasser gelöst wurde erfolgte die Messung im Photometer.

3.9.4 Spektralphotometrische Quantifizierung von RNS

Die Konzentration von RNS-Lösungen wurde spektralphotometrisch über die Extinktion von 1µl RNS-Lösung in 99 µl DEPC-Wasser bei 260nm bestimmt. Um die Qualität und Reinheit der RNS Lösung zu beurteilen wurde weiterhin die Extinktion bei 280nm gemessen. In diesem Absorptionsspektrum werden vorwiegend Proteine gemessen. Der Reinheitsgrad ergibt sich aus dem Quotienten OD_{260}/OD_{280} und ist akzeptabel bei 1,8-2,0.

Für RNS wird die Konzentration wie folgt berechnet:

$$\text{RNS-Konzentration in } \mu\text{g}/\mu\text{l} = (\text{OD}_{260} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 40 \cdot \text{Verdünnungsfaktor}) / 1.000$$

3.10 Reverse Transkription der RNS

3.10.1 Hintergrund/Prinzip

In der reversen Transkription werden RNS Stränge über eine RNS-abhängige-DNS-Polymerase in einzelsträngige cDNS umgeschrieben. Im vorliegenden Versuch wurde hierzu die Superscript II (Invitrogen) verwendet. Dies ist eine aus dem M-MLV (*Molony murine leukemia Virus*) isolierte Reverse Transkriptase, die sich durch besondere Thermostabilität, gute Produktspezifität und geringe RNase Aktivität auszeichnet.

Die als Reaktionsprodukt erhaltene cDNS kann später in der Quantitativen Real-time PCR als Template eingesetzt und so einzelne mRNS-Fraktionen quantifiziert werden.

3.10.2 Material / Reagenzien:

Superscript II (Invitrogen)
5XFirst strand Buffer (Invitrogen)
RNase OUT (40 units/ μ l) (Invitrogen)
Random Primer (Invitrogen)
dNTP je 10mM
0,1 M DTT (Invitrogen)
AMPUVA Wasser

3.10.3 Vorgehen

Dazu wurde in je einem Reaktionsansatz aus 2 μ g RNS in DEPC ein Gemisch aus zufälligen Hexanukleotiden (Random Primer :250 ng) und dNTP's (je 10 nmol von dATP, dTTP, dGTP und dCTP) zugefügt, auf 12 μ l mit AMPUVA Wasser aufgefüllt und 5 min lang bei 65°C erwärmt, um Sekundärstrukturen der RNS und der zugesetzten Oligonukleotide aufzulösen. Nach dem Abkühlen des Reaktionsansatzes im Eisbad wurden je 7 μ l einer Mischung aus First-Strand Puffer 4 μ l, DTT (23 mM) und Ribonuklease-Inhibitor (40U RNaseOUT, recombinant Ribonuklease Inhibitor, Invitrogen) hinzugefügt. Nach 10 Minuten bei 25°C und 2-minütiger Erwärmung auf 42°C folgte die Zugabe von 200U der SuperScript II reversen Transkriptase (Invitrogen) und die Inkubation bei 42° für 50 Minuten wobei die cDNS-Synthese, also die Verlängerung der Primer durch die reverse Transkriptase erfolgte. Anschließend wurde das Enzym 15 min lang bei 70 °C hitzeinaktiviert. Nach Abschluss der Reaktion wurde der Reaktionsansatz auf 100 μ l aufgefüllt und bei -20°C eingefroren.

3.11 Real-time quantitative PCR

3.11.1 Hintergrund/Prinzip

Bei der Realtime-PCR wird über verschiedene Methoden, die Menge des akkumulierenden PCR-Produktes gemessen. Es gibt verschiedene Messprinzipien,

die alle auf der Detektion eines spezifisch durch die Amplifikation erzeugten Fluoreszenzsignals basieren, dessen Intensität proportional zur gebildeten doppelsträngigen DNS-Menge ist. Zur Generierung des Fluoreszenzsignals wurde in folgendem experimentellen Ansatz der Farbstoff SYBR Green verwendet. SYBR Green ist ein Cyaninfluoreszenzfarbstoff, der in die „kleine Furche“ von doppelsträngiger DNS interkaliert und ein Anregungsmaximum bei 497nm und ein Emissionsmaximum bei 520nm besitzt. Während freies, ungebundenes SYBR Green nur ein sehr geringes Fluoreszenzsignal erzeugt, wird dieses Signal enorm verstärkt, sobald dsDNS gebunden wird. Am Ende der Reaktion wurde mittels der angeschlossenen Software (Startagene MX 4000) derjenige Amplifikationszyklus ermittelt, bei dem sich das gemessene Fluoreszenzsignal statistisch signifikant von der Hindergrundstrahlung abhebt. Diese Zykluszahl, an der die PCR-Reaktion in den gemessenen Proben die exponentielle Phase erreicht, wird als CT-Wert bezeichnet. Je weniger Template-Moleküle initial in einer Probe enthalten sind, desto mehr Amplifikationszyklen sind nötig, bevor ein signifikantes Fluoreszenzsignal messbar ist, und dementsprechend ergeben sich höhere CT-Werte.

Die Differenz der CT-Werte (ΔCT) gibt somit indirekt Auskunft über die initial vorhandenen Template Mengen (also auch mRNA Menge eines bestimmten Zielgens).

Um leichte Varianzen zum Beispiel im Volumen der Tubes zu kompensieren und die Fluoreszenzschwankungen auszugleichen wird in jedem Ansatz ein Referenzsignal gemessen, welches aus der Zugabe des ROX-Farbstoffes in den Master-Mix resultiert[100-102].

3.11.2 Primer zur Durchführung der Real-time quantitativen PCR

Die in der Real-time quantitativen PCR eingesetzten Primerpaare wurden so ausgewählt, dass sie Produkte zwischen 100-300 bp Länge amplifizieren. Die Primer-Sequenzen für die GDF-15 und GAPDH-cDNS liegen über Exon/Intron-Grenzen, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eventuelle Kontamination der cDNS-Proben mit genomischer DNS auszuschließen. Die ausgesuchten Primerpaare wurden zuerst in konventionellen PCR-Reaktionen mit cDNS als Template hinsichtlich ihrer Spezifität zur Ziel-cDNS vorgeprüft. Anschließend wurde mit Hilfe einer Standard Kurven Analyse ein PCR Setup ermittelt. In der mit möglichst hoher Effizienz ein möglichst spezifisches Amplifikat mit möglichst wenig Nebenprodukt

OLIGO	Start	Länge	3' Sequenz
<i>Linker PRIMER</i>	658	17	ACGAGCTACGGGGTCGC
<i>Rechter PRIMER</i>	784	21	CCCAATCTCACCTCTGGACTG

841 CCGAAGCCTACCGCGTGCACCGAGCGCTGCTCCTGCTGACGCCGACCCGCCCTGGG

3.11.5 Schmelzkurvenanalyse:

Nach einer erfolgten PCR Reaktion kann man die Qualität der Reaktion und des Reaktionsprodukts beurteilen. Hierzu wird in spezifischen Temperatur-Abständen und etwa 40 Zyklen die dsDNS erhitzt und somit denaturiert. Hierbei nimmt natürlich das Fluoreszenzsignal proportional zu sinkenden Menge an dsDNS ab. Spezifisch komplementäre DNS bindet abhängig von ihrem AT/GC Gehalt mit maximaler Stabilität und hat eine Schmelztemperatur über 80°C. Hier nimmt die Fluoreszenz schlagartig ab und erzeugt einen Peak in der Darstellung Abnahme pro Zeit. Produkte mit einer niedrigen Schmelztemperatur stellen Nebenprodukte und Primer Dimere da, die minimalisiert werden müssen und nicht berücksichtigt werden dürfen.

3.11.6 Normalisierung gegenüber „*Housekeeping-Genen*“ der Real-time quantitativen PCR

Die bei der reversen Transkription hergestellte Gesamt-cDNS aus myokardialem Gewebe sollte als Template in die Real-time quantitative PCR eingesetzt werden. Allerdings ist die cDNS-Synthese auch bei identisch eingesetzter RNS Mengen nicht so reproduzierbar, als dass sie als konstant angesehen werden kann. Um die Messwerte (CT-Werte) für jede Ziel-cDNS unterschiedlicher cDNS-Präparationen zu vergleichen, war es notwendig, die cDNS-Präparationen zu normieren. Darum wurde bei jeder quantitativen PCR parallel zum GDF-15 Gen auch das GAPDH-Gen gemessen. Das GAPDH-Gen (Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase) ist ein „*Housekeeping-Gen*“, das vergleichsweise konstant in allen Geweben und verschiedenen pathophysiologischen Zuständen exprimiert und häufig als Standard zur Quantifizierung von mRNS bzw. cDNS verwendet wird[103].

Verwendung von Kontrollen:

Die Verwendung von No-Template-Kontrollen zum Ausschluss von Kontaminationen, sowie einer No-RT-Kontrolle zur Überprüfung ob andere DNS mitgemessen wurde, empfiehlt sich genauso, wie die Überprüfung ob nicht genomische DNS mit amplifiziert wird.

3.11.7 Material/ Reagenzien

Stratagene MX 4000 Multiplex PCR System

Software

Brilliant SYBR Green Master-Mix Kit

ROX-Referenzfarbstoff (Stratagene)

Ampuva Wasser

QPCR Strips (Stratagene)

Filterspitzen (Sarsterdt)

3.11.8 Vorgehen

Master-Mix Ansatz

MIC/GDF-15 PCR:

Pro Reaktion	5µl	cDNS
	0,225µl	forward Primer
	0,225µl	reverse Primer
	0,375µl	ROX Dye
	6,675µl	Ampuva Wasser

GAPDH- PCR:

Pro Reaktion	5µl	cDNS
	0,350µl	Forward Primer
	0,359µl	reverse Primer
	0,375µl	ROX Dye
	6,425µl	Ampuva Wasser

3.11.9 Temperatur Setup:

Es wurde folgendes Setup verwendet:

Initiales Erhitzen auf 95°C für 10 Minuten, 40 Zyklen mit 30 Sek. 95°C, Annealing der Primer bei 1 Minute 57°, Elongation bei 30 Sek. 72° und Fluoreszenzmessung bei 82°C um kein unspezifisches Produkt zu Messen.

3.12 Immunhistochemie

3.12.1 Hintergrund/Prinzip

Das Prinzip der Immunhistologie beruht auf der spezifischen Detektion von Antigenen in Geweben, Schnitten oder Zellen durch Antikörper und der anschließenden Verstärkung des Signals durch Brückenantikörper. Das Antigen wird schlussendlich durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht, die vom Konjugat des Sekundärantikörpers abhängt. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die Vorbehandlung der Gewebe, d.h. dass die Bindungsstellen, die der Antikörper binden, soll nicht von der Fixierung zerstört oder maskiert wurden.

Das fixierte Präparat wird durch Vorbehandlung mit Detergenzien (Trypsin, Proteinase K, Triton X 100) permeabilisiert und die Antigene demaskiert. Nach der erforderlichen Blockierung der endogenen Peroxidase durch Wasserstoffperoxid wird der primäre Antikörper in einer Mischung aus BSA und PBS verdünnt oder als gebrauchsfertige Lösung auf den Schnitt gegeben. Durch Verwendung eines enzymgekoppelten oder aber Biotin-konjugierten Sekundärantikörpers wird dann der Primärantikörper gebunden. Im ersten Verfahren kann dann je nach Enzym ein Farbsubstrat direkt umgewandelt und dadurch ein Signal erzeugt werden, während bei der zweiten Methode der Biotin-Rest zusätzlich über einen Avidin-Biotin-Enzymkomplex (z.B. Peroxidase) *markiert* wird. Dies erzeugt den Vorteil, dass die Signalintensität, allerdings auch des Hintergrundes, durch die Mehrfachbiotinylierung gesteigert wird.

Die Farbreaktionen werden mit löslichen Substraten z.B. DAB ausgelöst, die durch das Enzym in einen unlöslichen Farbstoff überführt werden.

Die Sensitivität und Spezifität der Immunhistologie ist nicht unbegrenzt. Daher ist es unerlässlich geeignete Kontrollschnitte zu verwenden. So werden als Negativkontrolle Parallel-Schnitte ohne Primärantikörper gefärbt, wohingegen bei anderen die Antigenbindung des Primärantikörpers durch eine Blockierung seiner Bindungsstellen durch das spezifische Epitop des Proteins, oder das Protein im Ganzen, verhindert wird. Hierdurch erhält man schon näherungsweise einen Eindruck vom Signal-Hintergrundverhältnis. Um eine Prä-Blockierung zu erreichen, wurde der Primäre Antikörper über Nacht mit seinem korrespondierenden Epitop-tragenden Peptid unter leichter Rotation inkubiert.

3.12.2 Materialien/Reagenzien/ Geräte

Schneidemaschine

Mikroskop

OCT

Stickstoff

Objektträger

Färbeküvetten

Fixierungslösung

95% Ethanol

PBS

Permeabilisierungslösung

0,3% Triton in PBS

Waschpuffer

0,2% Tween in PBS

Blockingserum

15µl Horseserum in 1% BSA in PBS

DAB Reagenz

Nach Angaben des Herstellers

ABC Reagenz (Vectastain)

10µl Avidinreagenz+10µl biotinylierte Peroxidase

Wasser	
Hämatoxylinlösung	Hämatoxylin nach Meyer
Eosin-Lösung	1% Eosin in Wasser
Einbettmedium (Glycergel)	
Deckgläschen	

3.12.3 Vorgehen

Zunächst wurden aus den eingebetteten Gewebestücken parallele 6µm dicke Schnitte angefertigt. Nach Fixierung in 95% Ethanol für 10 Minuten bei Raumtemperatur, Trocknung und 3 Waschschritten in PBS für 5 Minuten wurden die Schnitte 15 Minuten bei 4°C in Permeabilisierungslösung inkubiert und erneut 3 mal 5 Minuten in PBS gewaschen. In 3% Wasserstoffperoxid in PBS erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase unter Lichtschutz, bevor die Schnitte 20 Minuten in Waschpuffer inkubiert wurden.

Nun erfolgte die Absättigung unspezifischer Antikörperbindungen, indem man auf den Schnitt unter einem Stückchen Folie 30µl Blockingserum aufbrachte und 30 Minuten bei Raumtemperatur einwirken ließ.

Nach vorsichtigem Ausschlagen des überschüssigen Serums, folgte die Inkubation mit entsprechendem Primärantikörper in geeigneter Verdünnung in BSA in PBS bei 4°C über Nacht. Anschließend wurde 3 mal 5 min in Waschpuffer gewaschen und 60 Minuten mit entsprechendem Sekundärantikörper (1:200) in BSA/PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer erneuten Waschprozedur in Waschpuffer wurde der Sekundärantikörper durch 60 minütige Inkubation mit 30µl ABC Reagenz pro Schnitt gebunden und nach Waschen mit DAB Reagenz nachgewiesen. Nach Entfernung überschüssiger Farbstoffreste mit Wasser, wurde mit Hämatoxylinlösung für 1 Minute und mehrmaligem Bläuen mit Leitungswasser eine Kerngegenfärbung erzeugt.

Zuletzt erfolgte die Einbettung in Glycergel Mounting-Medium und die Auswertung unter einem Mikroskop.

Zu histologischen Kontrolle des Zelltyps und zur Erkennung des eventuell vorhandenen nekrotischen Areals wurden Parallelschnitte anstelle der Immunfärbung einer konventionellen Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen:

Nach der üblichen Fixierung wurden die Schnitte je 60 Sekunden in Hämatoxylinlösung und 1%ige Eosin-Lösung geschwenkt und jeweils mit Wasser entfärbt. Das Einbetten erfolgte wie bei allen anderen Schnitten

3.13 Gewinnung von Geasamtzellprotein aus Geweben

3.13.1 Reagenzien/Material:

Lysispuffer Inhibitoren-Gemisch
Eisbad
Eppendorfgefäße
Gewebestößel
Zentrifuge

3.13.2 Vorgehen:

In etwa 100µl Lysispuffer wird mit einem Stößel in einem Eppendorfgefäß ein stecknadelkopfgroßes Gewebefragment zerstampft und mindestens 30 Minuten auf Eis lysiert.

Nach Abzentrifugation und Abnahme des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß wurde das Proteingemisch solange verdünnt, bis eine näherungsweise akzeptable Proteinkonzentration erzielt wurde (siehe Bradford-Methode).

3.14 Statistische Auswertung:

Die statistische Auswertung erfolgte über das Softwareprogramm „Sigma-Stat“. Alle Die statistischen Untersuchungen der Unterschiede zwischen Gruppen erfolgten mittels ANOVA und Student-Newmann-Keuls Post hoc Analyse. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet

4. Ergebnisse

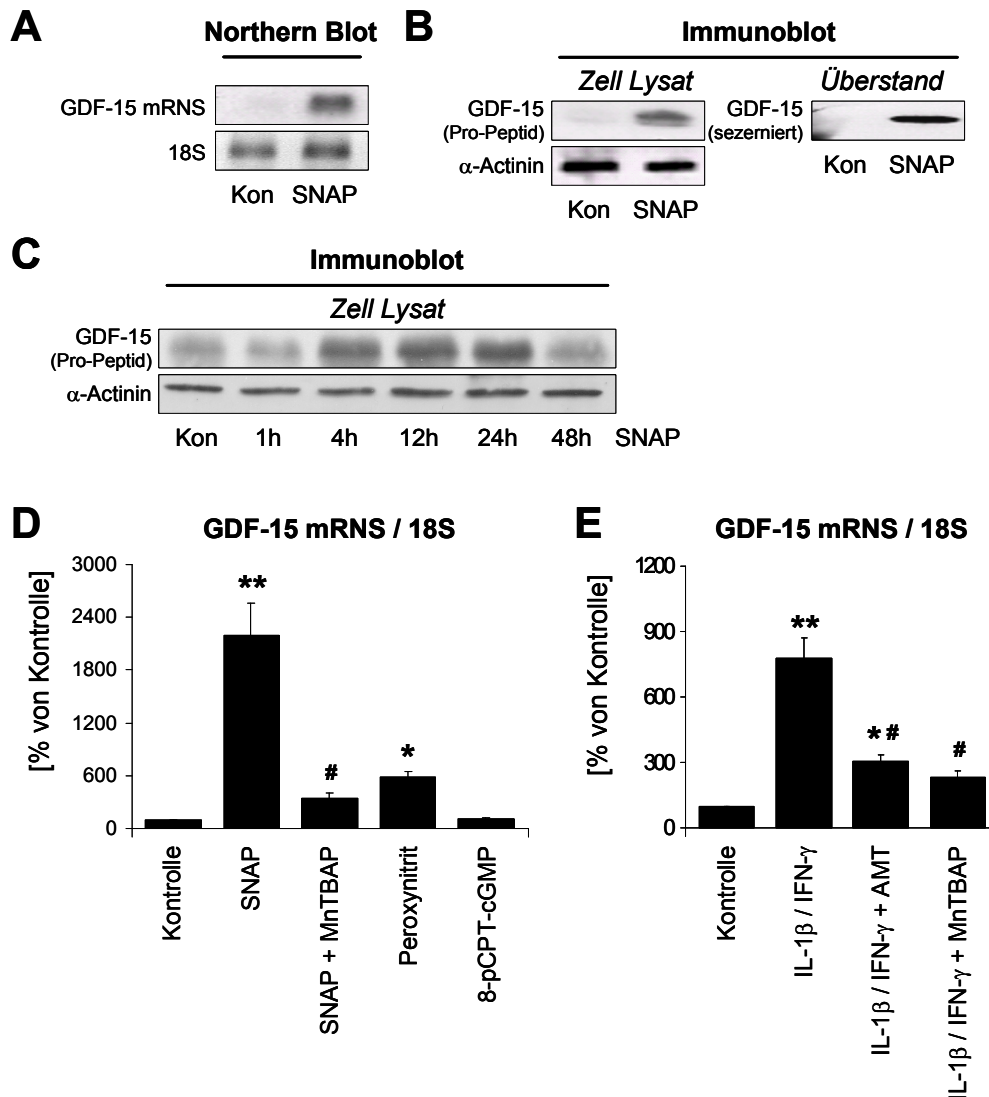
4.1 Stickstoffmonoxid (NO) reguliert die Expression von GDF-15

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Wollert konnte das Zytokin GDF-15 in einem cDNS Expressionsarray aus kultivierten Kardiomyozyten (~4000 Gene) als das Gen identifiziert werden, das nach Stimulation mit dem NO-Donor (SNAP 250 $\mu\text{mol/L}$) am stärksten induziert wurde. In zwei unabhängigen Experimenten steigerte NO die Expression von GDF-15 um den Faktor 20 gegenüber Kontrollzellen. Nach Bestätigung dieser Ergebnisse im Northern Blot-Verfahren konnte in Immunoblot Experimenten gezeigt werden, dass NO-Stimulation auch zu einer vermehrten Expression des GDF-15 Pro-Peptids intrazellulär und des reifen GDF-15 in sezernierter Form führte.

NO ist über verschiedene Mechanismen in der Lage, die Gen-Expression zu modulieren. Zum einen führt Stimulation von Kardiomyozyten mit NO zu einer Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase mit ansteigenden Spiegeln des „*second messengers*“ cGMP, zum anderen formieren NO und Superoxid-Radikale das sehr reaktionsfreudige und kurzlebige Peroxynitrit. Beide Substanzen sind über verschiedene Wege in der Lage die Transkriptionsaktivität zu beeinflussen[104-108]. Während auch unmittelbare Peroxynitrit-Stimulation (100 $\mu\text{mol/L}$) in Kardiomyozyten zu einer gesteigerten GDF-15 Expression führt, und Radikal-Fänger, wie MnTBAP (100 $\mu\text{mol/L}$), ein Superoxid-Dismutase Mimetikum, die NO-induzierte Expressionssteigerung von GDF-15 unterdrücken konnten, waren zellpermeable cGMP-Analoga, wie 8-pCPT-cGMP (500 $\mu\text{mol/L}$), nicht in der Lage, GDF-15 zu induzieren. Diese Ergebnisse legten den Schluss nahe, dass im Kardiomyozyten die NO-medierte GDF-15 Expression über cGMP unabhängige, Peroxynitrit/Superoxid abhängige Signaltransduktionswege gesteuert wird. Des Weiteren ließ sich zeigen, dass auch Induktoren der induzierbaren Isoform der zelleigenen NO-Synthase (NOS 2), wie Interleukin-1 β (IL-1 β) (10ng/mL) und Interferon- γ (IFN- γ) (50 ng/mL) in der Lage waren, eine Expressionszunahme der GDF-15 mRNS und des Proteins zu bewirken.

Koinkubation von Kardiomyozyten mit IL-1 β /IFN γ und NOS-2 Inhibitoren AMT (100 $\mu\text{mol/L}$) oder auch Radikalfängern wie MnTBAP unterdrückten diesen Effekt, was wiederum darauf hindeutet, dass Interleukin1 β und Interferon- γ die GDF-15 Expression über eine Induktion der zelleigenen NOS2 und Erzeugung von endogenen Nitro-Radikalen, bewirken[109, 110].

Abbildung 1



Northern und Western Blot-Ergebnisse zur GDF-15 Expression und kultivierten Kardiomyozyten

A Die Gdf-15 mRNA Induktion nach Stimulation mit dem NO-Donor SNAP für 24 Stunden in einer Konzentration von 250μmol/L. **B** Äquivalentes Experiment zur Bestimmung des GDF-15 Pro-Peptides, sowie des reifen, sezernierten Proteins im Überstand. **C** Zeitverlauf der GDF-15 Induktion durch den NO-Donor SNAP über 48h. **D** Induktion von GDF-15 durch SNAP und Peroxynitrit (100μmol/L), nicht jedoch durch das cGMP Analogon 8-pCPT-cGMP(500μmol/L). Unterdrückung des Induktionseffekts durch die Koinkubation mit MnTBAP (100μmol/L). **E** Die Induktion von GDF-15 durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1β (10ng/mL) und IFN-γ (50ng/mL) ist unterdrückbar durch Koinkubation mit NO-Synthase-Inhibitoren AMT (100μmol/L) und MnTBAP (100μmol/L). *p<0,05, **p<0,01; #p<0,01 vs. Stimulation mit SNAP/IL1β/IFN-γ.

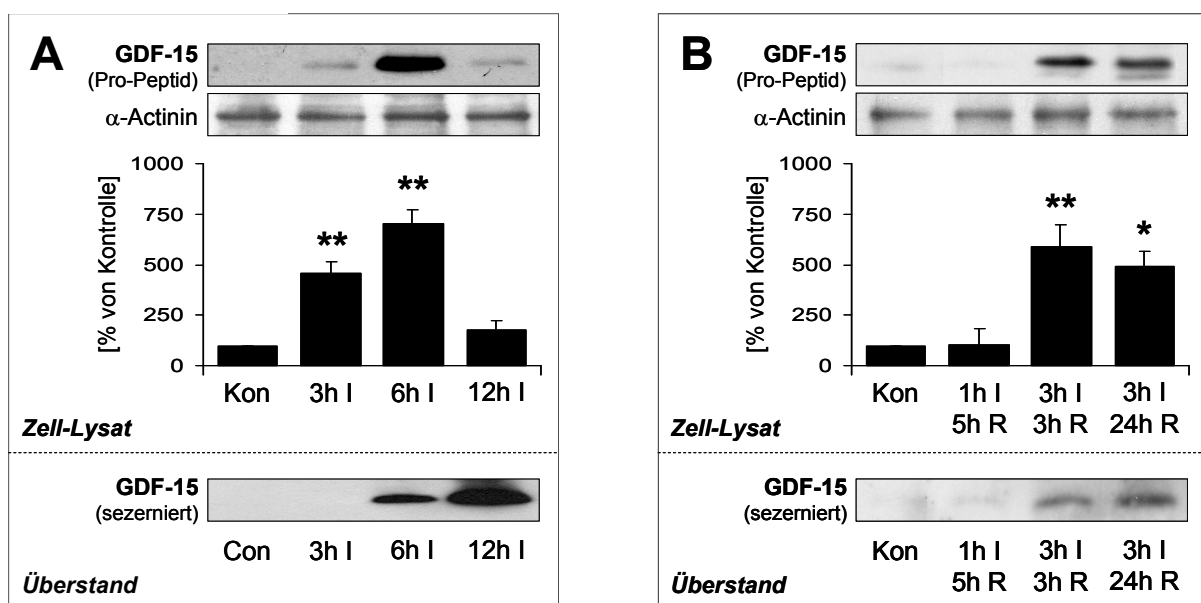
4.2 Simulierte Ischämie / Reperfusion induziert die Expression von GDF-15

Da sowohl NO, Peroxynitrit und Superoxid Radikale, wie auch die induzierbare Isoform der NO-Synthasen (NOS2) in der Pathophysiologie des Ischämie-Reperfusionsschadens eine dominante Rolle spielen, wurde nun näher untersucht, ob auch unter Ischämie- und/oder Reperfusionsbedingungen Kardiomyozyten vermehrt GDF-15 produzieren und sezernieren.

4.2.1 *In Vitro* Versuche unter simulierter Ischämie-Reperfusion

Isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten wurden 3-12 Stunden simulierten Ischämie-Bedingungen ausgesetzt und einige von ihnen später reperfundiert. Als Vergleichszellen dienten Kardiomyozyten, die während der gesamten Periode bei 37°C in Maintenancemedium kultiviert wurden. Es wurde nach Ischämie und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Reperfusion Gesamtzellprotein und überstehendes Zellkulturmedium gewonnen. Hier konnte gezeigt werden, dass sowohl simulierte Ischämie (4,8fache Induktion nach 3h), als auch Ischämie-Reperfusion (5,9fach vs. Kontrolle nach 3h Reperfusion und 3h Ischämie) zu einer gesteigerten Proteinexpression und Sekretion von GDF-15 Protein, im Vergleich zu Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen, führt.

Abbildung 2



Ergebnisse

Western Blot-Ergebnisse zur GDF-15 Expression und kultivierten Kardiomyozyten nach Ischämie und Ischämie- Reperfusion

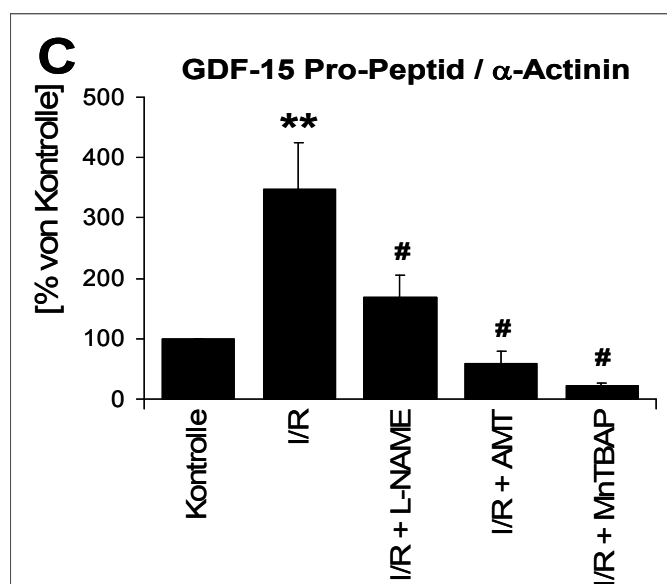
A Die Gdf-15 Pro-Peptid und Protein Induktion nach Simulierter Ischämie zu verschiedenen Zeitintervallen (n=3-5). **B** Äquivalentes Experiment zur Bestimmung des GDF-15 Pro-Peptids, sowie des reifen, sezernierten Proteins im Überstand nach simulierter Ischämie-Reperfusion (n=3-5).

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle.

4.3 Regulation der ischämie-induzierten GDF-15 Expression

Um die Mechanismen der GDF-15 Expression genauer zu untersuchen, wurden die Zellen einer simulierten Ischämie-Reperfusion ausgesetzt, während sie mit dem Radikalfänger und Peroxynitrit-Scavenger MnTBAP (100 μ mol/L) und den Stickstoffmonoxid-Synthase-Inhibitoren (NOS) L-NAME (100 μ mol/L) und AMT (100 μ mol/L) inkubiert wurden. Es ist bekannt, dass Kardiomyozyten vor allem in der Reperfusion vermehrt oxidativem Stress in Form von Sauerstoff- und Stickstoffradikalen, ausgesetzt sind. Sauerstoff und Stickstoffradikale formen intrazellulär das extrem kurzlebige Peroxynitrit (HWZ 1 Sekunde). Sowohl die Behandlung mit L-Name, AMT und MnTBAP konnte die I/R induzierte Expression von GDF-15 verhindern, dieses deutet auf eine große Bedeutung der zelleigenen NO-Synthasen und zellulärer Sauerstoff- und Nitroradikale bei der Expressionsinduktion von GDF-15 hin.

Abbildung 3:



Ergebnisse

Stickstoffmonoxid und Radikale erzeugen die reperfusionsinduzierte GDF-15 Expression

Kardiomyozyten wurden einer simulierten Ischämie (3Std.) und Reperfusion (24Std.) unterzogen. Einige Kulturschalen wurden mit NOS2 Inhibitoren AMT und L-NAME, sowie MnTBAP als Radikalfänger inkubiert. Es zeigte sich dass die simultane Inkubation mit Radikalfängern und NO-Synthase-Inhibitoren die reperfusionsinduzierte GDF-15 Expressionssteigerung unterdrücken können.

***p<0,01; #p<0,01 vs. I/R allein*

4.4 GDF-15 mRNS Expression in murinem Myokard *in vivo* nach chronischem Myokardinfarkt und Ischämie-Reperfusion

4.4.1 Etablierung einer quantitativen, GDF-15-spezifischen Real-time PCR

a) Standardkurvenanalyse

Nach Design spezifischer Primerpaare (DNS-Sys) wurden geeignete Realtime-PCR Bedingungen etabliert, die eine ausreichend genaue Amplifizierung verschiedener GDF-15 mRNS-Initialkonzentrationen ermöglichten. Hierzu wurden verschiedene cDNS Mutterstrang (*Template*) Konzentrationen und Mastermix Varianten getestet. Es wurde mit Hilfe der SYBR Green Methode und einer Stratagene MX 4000 Multiplex-PCR eine Standard-Schmelzkurven Analyse durchgeführt. Hierzu wurde in Triplikaten eine cDNS-Verdünnungsreihe aus Konzentrationen von 1:1 bis 1:10.000 erstellt und die CT-Werte der PCR Amplifikationsreaktionen verglichen. Die resultierende Standardgerade aus Verdünnung (relative Quantität) auf der Abszisse und CT-Wert auf der Ordinate erlaubt durch seine Steigung Rückschlüsse über die Effizienz der PCR Bedingungen. Die Analyse zeigte, dass unter den letztendlich gewählten PCR-Bedingungen, mit den erstellten GDF-15 Primerpaaren, im Middle eine optimale PCR Effizienz zwischen 92-98% erreicht wurde.

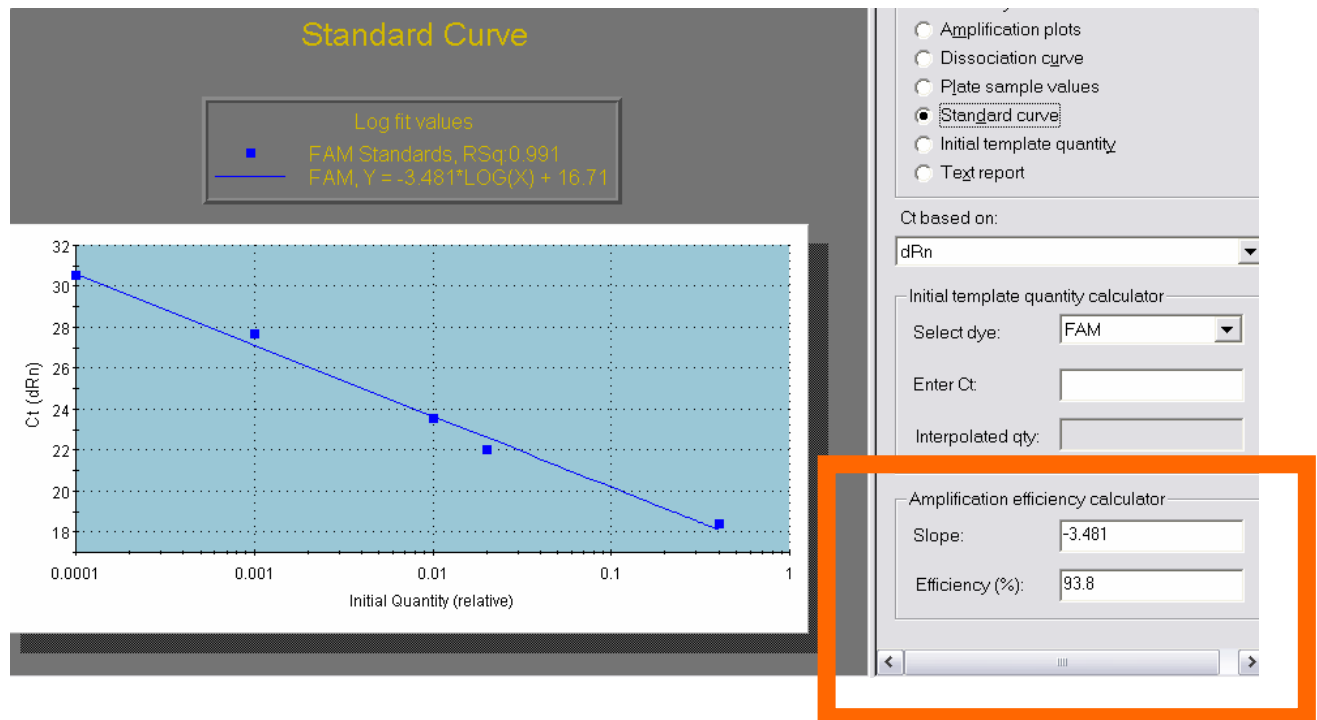


Abbildung 4:

Analyse einer Standardkurve aus der GDF-15 Real-time PCR

Gezeigt ist das Resultat einer typischen GDF-15 Real-time PCR Standardkurve. Dargestellt sind die Zyklen in denen ein signifikant über dem Hintergrund fluoreszierendes SYBR Green Signal gemessen wurde (Ct Werte; Y-Achse) gegen die cDNS abnehmenden Verdünnungen (relative Quantität: x-Achse) aufgetragen.

Aus der Steigung der Geraden (Slope) errechnet eine Software (Stratagene) die PCR-Effizienz.

b) Schmelzkurvenanalyse

Um die Qualität des Amplifikationsproduktes und eventuell entstehende Nebenprodukte beurteilen zu können, wurde eine Schmelzkurvenanalyse erstellt.

Die resultierende sprunghafte Abnahme der Fluoreszenz während des Schmelzvorgangs oberhalb von 80°C konnte als schmale Zacke in der Darstellung Abnahme pro Zeit beurteilt werden. Unter den für GDF-15 verwendeten PCR Bedingungen zeigte sich ein einzelner schmaler *Peak* oberhalb einer Temperatur von 84°C. Dies unterstützt die Annahme, dass ein einzelnes spezifisches Produkt gemessen wurde, ohne durch Primer-Dimere oder unspezifische Doppelstrang-DNS verfälscht zu werden.

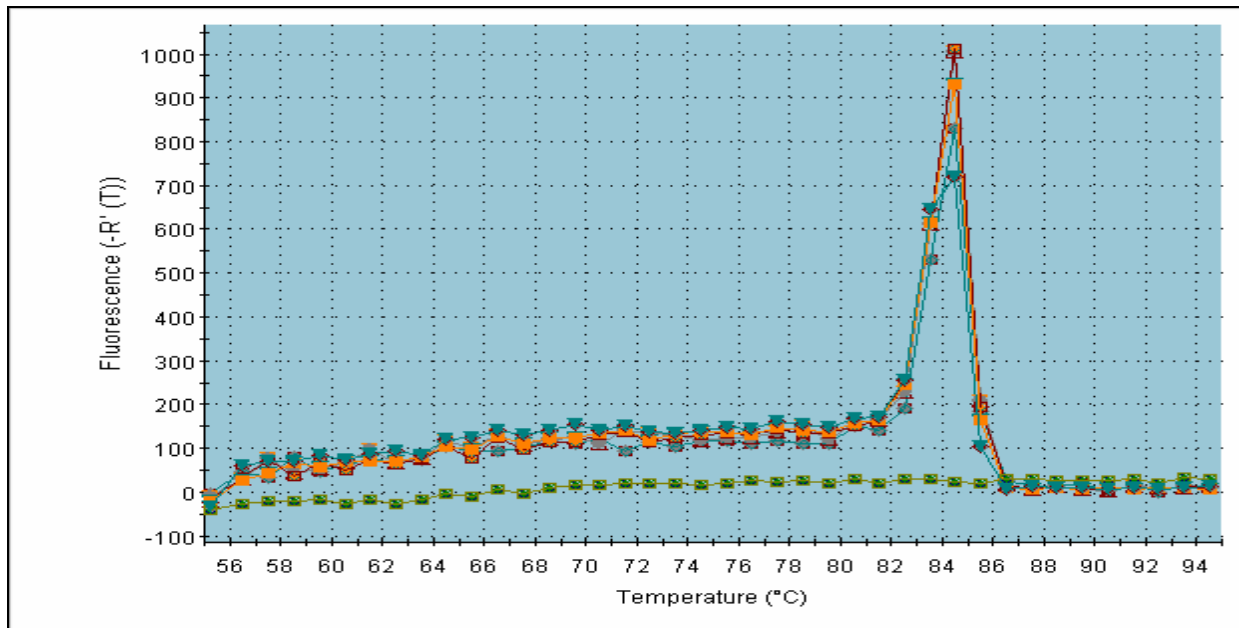


Abbildung 5:

Darstellung einer typischen Schmelzkurve, die im Anschluss an eine Standardkurvenanalyse durchgeführt wird.

Zu sehen ist die schmale Zacke, die in der Darstellung Abnahme pro Zeit den sprunghaften Fluoreszenzabfall symbolisiert, die durch die schnelle Aufschmelzung besonders fest aneinander bindender Nukleinsäurestränge erzeugt wird. Peaks unterhalb einer Temperatur von 80°C resultieren aus der Aufschmelzung von unspezifischem Produkt und Primer Dimere, sind aber unter den gewählten Bedingungen nicht vorhanden.

4.4.2 GDF-15 mRNA Expression nach Induktion eines experimentellen chronischen Myokardinfarkts und nach Ischämie-Reperfusion im Mausmodell

Um zu evaluieren, ob auch in murinem Myokardgewebe eine gesteigerte GDF-15 Expression nach Infarkt zu beobachten ist, und ob auch nach Ischämie-Reperfusion vermehrt GDF-15 im Myokard produziert wird, wurden entsprechend operierte C57 *Black 6* Mäuse untersucht. So ließ sich auch die zeitliche Kinetik der GDF-15 Induktion genauer evaluieren. Zusätzlich konnten so Vorgänge durch *post-mortem* Autolyse minimiert werden, die bei Autopsie-Biopsien das Ergebnis verzerren könnten.

Die GDF-15-mRNA-Expression wurde nun mittels der etablierten Real-time PCR Bedingungen an Myokardgewebe von Mäusen vorgenommen, deren *Ramus interventricularis anterior* für die indizierten Zeitpunkte dauerhaft oder temporär

Ergebnisse

(1Stunde) unterbunden wurde. So konnten Bedingungen im Tiermodell simuliert werden, wie sie auch im klinischen Alltag auftreten: Myokardinfarkt mit oder ohne Reperfusionstherapie. Es wurde Infarkt-Gewebe bzw. AAR (entspricht dem temporär ischämischen Gewebe) und nicht-infarziertes (Remote Myokard) Gewebe von je 5 Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten eines experimentelle Myokardinfarktes verwendet und gegen scheinoperierte Tiere (Sham-OP) verglichen.

Vorausgehend lässt sich die Eignung des GAPDH als Housekeeping Gen demonstrieren, da die GAPDH-Expression keine signifikante Induktion nach Ischämie und Ischämie-Reperfusion erfährt.

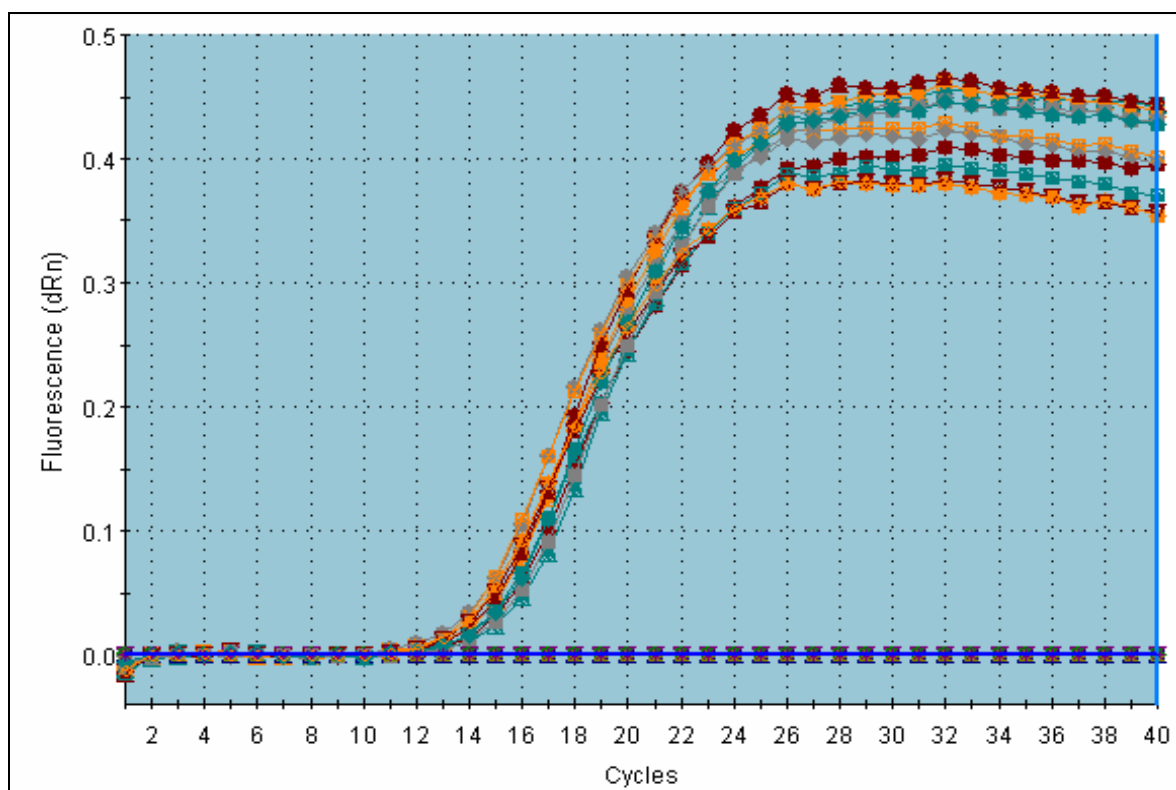


Abbildung 6:

Darstellung des Amplifikation-Plots der GAPDH-PCR aller gezeigten Proben

Um Schwankungen der RNS-Konzentrationen auszugleichen, die aus Ungenauigkeiten beim Pipettieren und durch RT-Schwankungen entstehen, werden die GDF-15 mRNA Level gegen GAPDH als Housekeeping Gen abgeglichen.

Um relative Expressionslevel an GAPDH, bei gleich in die RT eingesetzten RNS Konzentrationen zu demonstrieren ist ein typisches Ergebnis dargestellt. Es zeigen sich nur minimale Expressionsschwankungen, während auch hier die No Template Kontrollen keine Amplifikation zeigen

Als Negativkontrollen wurden Ansätze, ohne cDNA Inhalt, so genannte *No Template* Kontrollen verwendet. Die Zusammenstellung der Experiment-Daten zeigt, dass

Ergebnisse

bereits 1 Stunde Ischämie oder 1 Stunde Ischämie und 1 Stunde Reperfusion zu einer signifikanten Induktion von GDF-15 auf mRNA Ebene führt (3,8fach für Ischämie 1h; 5,1fach für 1h Ischämie 1h und Reperfusion, jeweils vs. Sham Operation). Die Induktion war anhaltend und erreichte jeweils nach 24h Infarkt bzw. 24h Reperfusion ihr Maximum (15,9fach für Ischämie 24h; 21fach für Ischämie 1h und Reperfusion 24h, jeweils vs. Sham Operation). Auch noch nach 7 Tagen ließen sich signifikant höhere GDF-15 mRNA Level im Infarkt bzw. in der Area at risk nachweisen, was auf eine Rolle von GDF-15 im post Infarkt Umbauprozess hindeuten könnte.

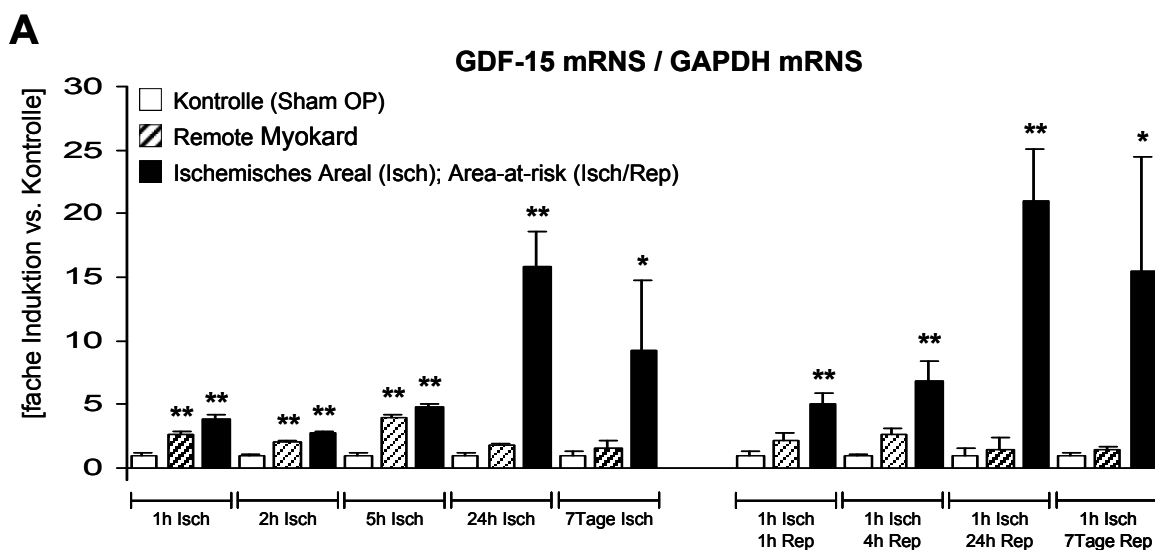


Abbildung 7: Zusammenfassung der Ergebnisse:

GDF-15 mRNA-Level der Infarkt-Areale bzw. der AAR aller Zeitpunkte (je $n=5$) wurden gegen Remote-Myokard und Schein-Operiertes Myokard verglichen. Dargestellt ist die statistische Auswertung der Mittelwerte und Standardfehler. Er zeigt eine signifikante Induktion der GDF-15 mRNA im Infarktmyokard gegenüber dem Gewebe von Sham operierten Tieren bereits nach 1 Stunde Ischämie (etwa 5-fach), sowie auch nach einer Stunde Ischämie und einer Stunde Reperfusion. In beiden Operationsmodellen blieb die GDF-15 mRNA-Induktion dauerhaft nachweisbar und war selbst nach 7 Tagen Ischämie und Ischämie-Reperfusion noch präsent. * $p<0,05$; ** $p<0,01$

4.4.3 Proteinexpression nach chronischer Ligatur der Koronararterie und Ischämie-Reperfusion

Nach Gewinnung des Gesamt-Proteins aus dem infarzierten Bereich und der Area-at-Risk und scheinoperierten Tieren wurde eine 12% SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt und nach Immunoblotting mit einem Anti-Maus GDF-15 Antikörper die GDF-15 Proteinkonzentrationen untersucht. Als Housekeeping Gen wurde hier Alpha-Actinin verwendet. Wie die GDF-15 mRNA zeigt auch das GDF-15 Protein eine signifikante Induktion bereits nach 5h Stunden Ischämie (2,3fach), die ebenfalls nach 7 Tagen um das 2,9fache gegenüber Remote-Myokard und scheinoperiertem Myokard erhöht blieb. Auch konnten so, die Ergebnisse der GDF-15 Proteinexpression, ohne autolytische Vorgänge in einem streng kontrollierten Tiermodell unterstützt werden.

Auch nach temporärer, einstündiger Ligatur des Ramus interventricularis anterior konnte im Gebiet der Area at risk nach 4 Stunden Reperfusion (3,2fach) und nach 24 Stunden Reperfusion (4,4fach), sowie selbst nach 7 Tagen (3,5fach jeweils vs. Sham OP) eine signifikant höhere GDF-15 Proteinexpression detektiert werden.

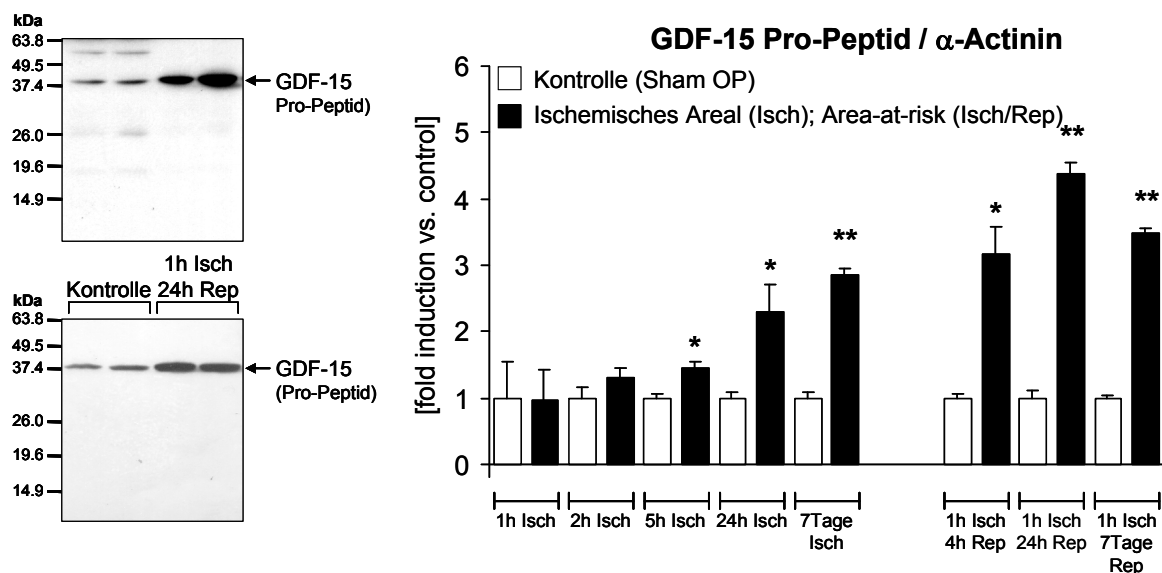


Abbildung 8: Zusammenfassung der Ergebnisse:

GDF-15 Protein-Level der Infarktareale aller Zeitpunkte (je $n=5$) wurden gegen Schein-Operiertes Myokard verglichen. Dargestellt ist die statistische Auswertung der Densitometrie mit Mittelwerten und Standardfehler (* $p<0,05$). Er zeigt eine ansteigende, nach 14 Stunden signifikante Induktion des GDF-15 Proteins im Infarktmyokard gegenüber dem Myokardgewebe von Sham operierten Tieren.

Links: Beispiel-Immunoblots für die erhöhte Proteinexpression im murinen experimentellen temporären oder dauerhaften Myokardinfarkt.

4.4.4 Immunhistologische Lokalisation von GDF-15 im ischämisch-reperfundierten Herzen

Um weiter zu evaluieren, welche Areale und welcher Zelltypus im ischämisch-reperfundierten Herzen für die erhöhte GDF-15 Proteinexpression verantwortlich ist, wurden Gelfrierschnitte immunhistologisch mit Hilfe eines Anti-GDF-15 Antikörpers gefärbt (SantaCruz). Es wurden Gewebeareale von Tieren untersucht, die 4 Stunden nach Reperfusion entnommen wurden, und diese gegen Tiere verglichen, die einer Schein Operation unterzogen waren. Um die Spezifität der Antikörperreaktion zu bestätigen, wurden Parallelschnitte sowohl ohne Primärantikörper, wie auch mit murinem GDF-15-Peptid prä-blockiertem Primärantikörper gefärbt. Zur Visualisierung der Nekrose und der Zellstrukturen wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen verwendet.

Es zeigte sich, dass sich vor allem in den nekrose-angrenzenden Arealen der Gewebeschnitte vermehrt GDF-15-Protein nachweisen lässt. Der zelluläre Ursprung des Proteins war sowohl kardiomyozytär, aber auch in Endothelien zu finden. Interzellulär ist bereits sezerniertes GDF-15 angefärbt. Die Spezifität der Immunfärbung konnte durch die entsprechend negativen Parallelschnitte mit Peptid-Prä-Blockierung und ohne Primärantikörperinkubation demonstriert werden.

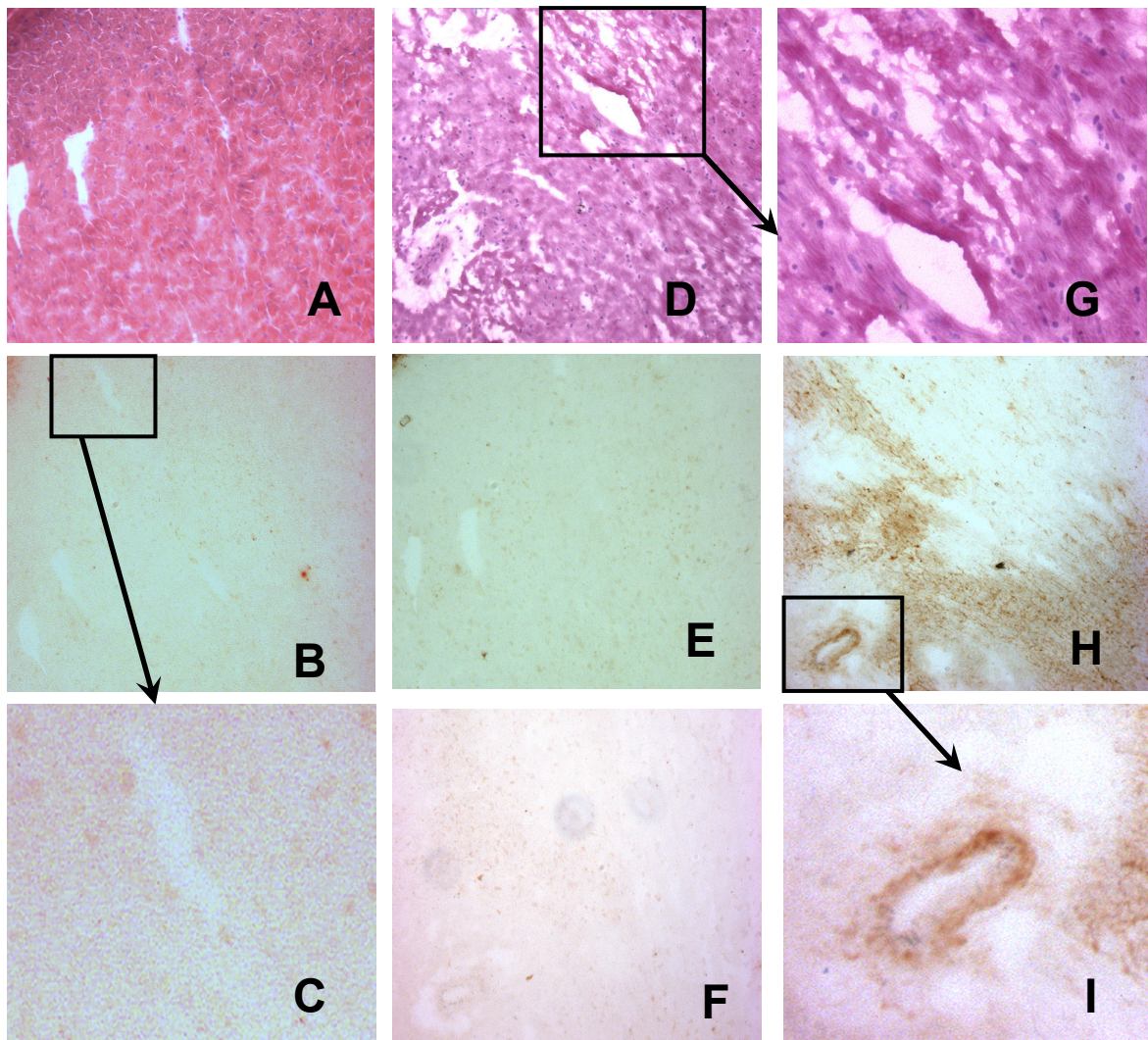


Abbildung 9:

Immunhistologischer Nachweis von GDF-15 in der murinen kardialen Ischämie-Reperfusion.

Zu sehen sind linksventrikuläre Parallelschnitte mit 6µm Dicke von Tieren mit 4 Stunden Reperfusion und entsprechenden Sham-operierten Tieren.

A Schnitte von Sham operierten Mäusen in HE Färbung, erwartungsgemäß ist vitales Myokard mit typischer Struktur zu sehen. **B** Schnitte mit Anti-GDF-15 Immunfärbung. Hier zeigt sich bei Sham operierten Tieren sowohl in den Endothelien (**C**), wie auch in den Kardiomyozyten keine verstärkte GDF-15 Expression. **D** HE-Färbung eines Ischämie-Reperfusion operierten Tieres. Dargestellt sind verschiedene Gefäßanschnitte und ein Areal (Zoom: **G**), welches deutliche Charakteristika einer Nekrose zeigt: fibrinoide Hypereosinophilie und Verlust der Zellkernfärbung. **E** Schnitte ohne GDF-15

Ergebnisse

Antikörper. H Die GDF-15 Immunofärbung demonstriert hier eine deutliche Expression im perinekrotischen Bereich, im Endothel (Zoom: I), nicht aber im nekrotischen, avitalen Areal. F Die Prä-Blockierung des Primärantikörpers mit murinem GDF-15 hebt die Immunoreaktivität auf, als Anhalt für die Spezifität der Antigen-Antikörper Reaktion.

4.4.5 GDF-15 Proteinexpression in humanen Myokardgewebe

Es wurde Autopsiematerial von Patienten verwendet, die zu verschiedenen Zeitpunkten an einem Myokardinfarkt oder seinen direkten Folgen verstorben waren. linksventrikuläre Gewebebiopsien aus dem infarzierten Areal wurden im Westernblot gegen Myokardgewebe von Patienten verglichen, die an nicht kardiologischen Ereignissen verstorben waren. (Material von Nijmeijer, R; Niessen HWM; Hack, CE et al; Amsterdam; Niederlande).

Mit Hilfe eines Antikörpers gegen humanes GDF-15 (R&D) wurden bei jeweils 5-6 Biopsieproben gegen Kontroll-Patienten die Expressionshöhen nach 1-12 Stunden, 12-72 Stunden und nach 9-15 Tage nach Symptombeginn verglichen. Die Proteinexpression wurde gegen Alpha-Actinin als Housekeeping Gen abgeglichen.

Es zeigte sich bereits nach weniger als 12 Stunden im humanen infarzierten Myokard im Mittel eine signifikante GDF-15 Induktion ($4,3 \pm 1,2$ fach gegenüber Kontrollpatienten). Auch bei Patienten, die 24-72 Stunden nach Symptombeginn an ihrem Myokardinfarkt verstorben waren, konnte man eine $4,7 \pm 0,7$ fach höhere GDF-15 Expression als in Patienten finden, die an nicht kardiovaskulären Erkrankungen verstorben waren. Dass die vermehrte Proteinexpression von GDF-15 nicht ausschließlich im Rahmen des Akutgeschehens Ischämie eine Rolle zu spielen scheint, zeigt die Tatsache, dass auch nach 9-15 Tagen signifikant höhere GDF-15-Proteinmengen gegenüber den Kontrollpatienten messbar waren ($3,8 \pm 1$ fach). Berücksichtigt man zusätzlich eine erfolgte Reperfusionstherapie, so führte eine Reperfusionstherapie zu einer 4,8 fachen GDF-15 Induktion gegenüber der Kontrolle (n=5), während Patienten ohne Reperfusionstherapie einen etwa 4fach erhöhten GDF-15 Spiegel intramyokardial zeigten (n=12).

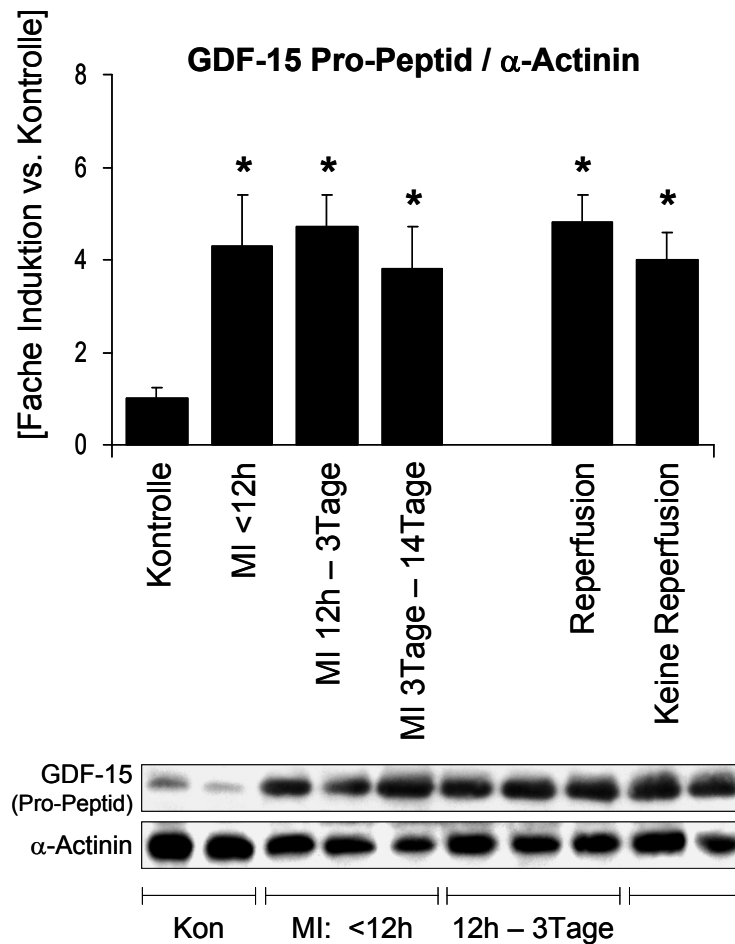


Abbildung 10:

Einfluss myokardialer Ischämie auf die humane GDF-15 Protein-Expression

*Humanes Biopsiematerial von an Myokardinfarkt verstorbenen Patienten wurde im Westernblot zu verschiedenen Zeitpunkten gegen Myokardgewebe verglichen, das aus Patienten stammte, die nicht an kardiovaskulärer Ursache verstorben waren. Die Densitometrie aller Patienten wurden gegen die Alpha-Actinin Expression normalisiert, mit Mittelwert und Standardfehler statistisch ausgewertet und als Vielfaches der Kontrollpatienten dargestellt. (N=5-6); * $P < 0,05$)*

Ein typischer Blot ist in der Abbildung unten zu sehen, 35 μ g Protein wurden in einem 9% SDS Page aufgetrennt, dargestellt sind sowohl die GDF-15, wie auch die entsprechende Alpha-Actinin-Expression.

4.4.5.1 Immunhistochemische Untersuchungen an humanem Myokardgewebe nach Myokardinfarkt.

Ob auch im humanen Myokard vor allem Kardiomyozyten die Quelle für die Ischämie induzierte GDF-15 Expression sind, oder ob auch andere Zelltypen dazu beitragen, wurde ebenfalls an diesen Autopsiematerialien untersucht. Hierfür wurden Gewebeschnitte aus dem Myokard mit Antikörpern gegen humanes GDF-15 gefärbt. Weiterhin erfolgte eine Anti-Komplement C3d-Färbung in Parallelschnitten, um vitales von irreversibel geschädigtem Myokard zu unterscheiden[111].

Auch hier konnte, ähnlich wie im Mausmodell, eine vornehmlich in den Kardiomyozyten im infarzierten Bereich stattfindende Induktion von GDF-15 gezeigt werden, während in nicht infarzierten Myokardschnitten kaum GDF-15 detektierbar war.

(Färbung vorgenommen durch die kooperierende Arbeitsgruppe um HWM. Niessen).

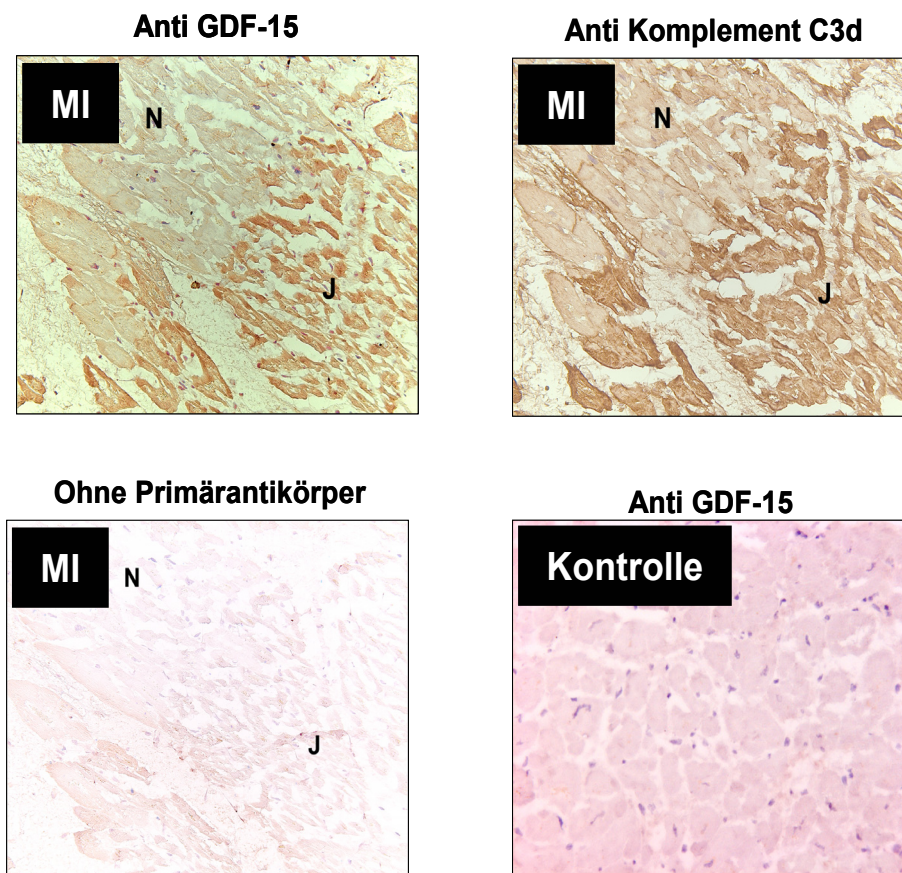


Abbildung 11:

Immunhistochemische Färbung an humanen myokardialen Gewebeschnitten.

Dargestellt sind die Anfärbung von Gewebeschnitten eines an einem Myokardinfarkt verstorbenen Patienten mit einem humanen Anti-GDF-15 Antikörper und einem Anti C3d Antikörper. Als Kontrollen dienten Schnitte von Patienten, die an nicht kardialer Ursache verstorben waren, die jeweils mit und ohne Anti-GDF-15 gefärbt wurden.

4.5 Protektive Effekte von GDF-15 auf Kardiomyozyten bei simulierter Ischämie-Reperfusion

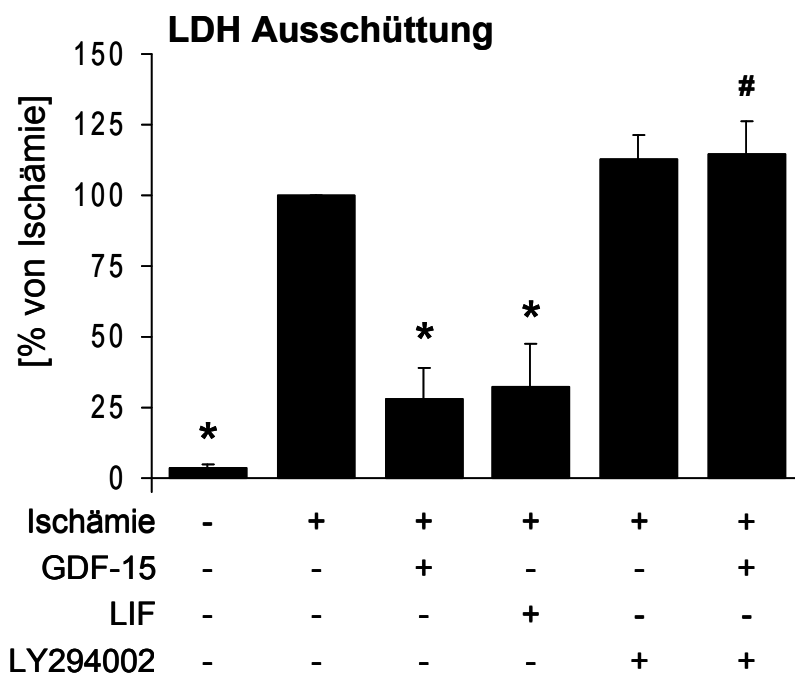
Während in der Ischämie Zelluntergang maßgeblich durch den nekrotischen Zelltod gekennzeichnet ist, finden in der Reperfusion sowohl nekrotische, wie auch apoptotische Zelltodereignisse statt. Nun wurde in folgenden Experimenten untersucht, ob die Expressionssteigerung von GDF-15 in diesem Kontext eine Rolle spielt.

4.5.1 GDF-15 unterdrückt den nekrotischen Zellschaden während myokardialer Ischämie *in vitro*

Die Zerstörung der Integrität der Zellmembran ist ein Charakteristikum des nekrotischen aber auch spät-apoptotischen Zelltods. Durch den Zusammenbruch der Zellmembranbarriere kommt es zum Austritt zytosolischer Proteine, wie der Laktat-Dehydrogenase (LDH) in das umgebende Interstitium.

Nach 4 Stunden simulierter Ischämie wurde die LDH-Freisetzung in den Zellüberstand bestimmt. Es lässt sich zeigen, dass simulierte Ischämie zu einem signifikanten Anstieg der Laktat-Dehydrogenase-Aktivität im Zellkulturmedium führt. Dieser Anstieg lässt sich sowohl durch LIF (1nM) und humane GDF-15 (3nM) Stimulation signifikant reduzieren (100 vs. 32±15% für LIF und 100 vs. 28±10% für GDF15; $p < 0,05$). Dieser zellprotektive Effekt von GDF-15 konnte durch Koinkubation der Kardiomyozyten mit PI3Kinase Inhibitoren, wie LY294002 (10µmol/L) reduziert werden ($p < 0,05$).

In der frühen Reperfusion hingegen, konnten wir keine vermehrte Freisetzung von LDH in das Zellkulturmedium messen.

**Abbildung 12:**

Die anti-nekrotische Wirkung von GDF-15 auf ischämische kultivierte Kardiomyozyten ist durch eine Inhibierung der PI3Kinase reversibel

*Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 7 Experimenten, in denen die LDH-Aktivität im Zellüberstand nach simulierter Ischämie gemessen wurde. Simulierte Ischämie führt zu einem signifikanten Ausstoß von LDH ins Zellkulturmedium (100% vs. 2%). Dieser Ausstoß kann über LIF und GDF-15 Stimulation signifikant verringert werden (32% für LIF bzw. 28% für GDF-15 vs. 100% für I/R). Während eine Stimulation mit humanem GDF-15 zu einer signifikanten Reduktion der LDH-Aktivität im Zellkulturmedium führt, ist dieser Effekt bei Kostimulation mit dem PI3Kinase Inhibitor LY294002 nicht zu beobachten. * $p < 0,05$; # $p < 0,05$ vs. I/R+GDF-15*

4.5.2 GDF-15 vermindert den apoptotischen Zelltod in der Reperfusion

Da der zelluläre Reperfusionsschaden neben einer nekrotischen Komponente maßgeblich durch einen apoptotischen Zelltod gekennzeichnet ist, wurde nun untersucht, ob GDF-15 in der Lage ist auch diesen Zelltodmechanismus zu beeinflussen.

Auch in den hier präsentierten Experimenten konnte in der Ischämie keine erhöhte Rate apoptotischer Ereignisse nachgewiesen werden, wohingegen die ersten

Ergebnisse

Minuten der Reperfusion durch eine Zunahme apoptotischer Zellkerne in den kultivierten Kardiomyozyten gekennzeichnet war.

Mit drei unterschiedlichen Methoden wurde nun untersucht, ob GDF-15-Stimulation in der Reperfusion Einfluss auf Apoptose hat.

Die Entstehung mono- und oligonukleosomaler Fragmente in der Apoptose kann mit einem kommerziellen Anti-Histon/ Anti-DNS Sandwich ELISA gemessen werden.

Die 2. Nachweismethode bezieht sich auf die *in situ* Detektion entstehender Strangbrüche durch das Prämarkieren mit Digoxigenin-konjugierten dUTP's, die in einer Folgereaktion durch eine Fluoreszenzkonjugierten Anti-Digoxigenin Antikörper gebunden werden (TUNEL-Reaktion).

Die Exposition von Phosphatidylserin an der Außenseite der Zellmembran ist eines der frühesten Ereignisse in der Apoptose. Über *Labeling* mit FITC-markiertem Annexin können solche Zellen im FACS quantifiziert werden. Über den gleichzeitigen Ausschluss Propidiumiodid positiver Zellen (nekrotisch oder spät apoptotisch) konnten so spezifisch apoptotische Zellen erkannt und ausgezählt werden

Es wurden unstimulierte Zellen, *Leukemia-Inhibitory-Factor* (1nM) und hGDF-15 (3nM) stimulierte Zellen nach simulierter Ischämie-Reperfusion (3h Ischämie, 1h Reperfusion mit Kardiomyozyten unter Kontroll-Kulturbedingungen verglichen (n=4-5).

4.5.2.1 Messung apoptotischer Kardiomyozyten im Cell death detection Assay

Es zeigt sich eine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen nach 60 Minuten Reperfusion, die durch periexperimentelle LIF- und GDF-15 Stimulation signifikant reduziert werden konnte. Während nach 3 Stunden Ischämie und 60 Minuten Reperfusion die Signalintensität von $33,7 \pm 7\%$ auf 100 % zunahm, war gleichzeitig der Anstieg durch GDF-15 Stimulation bei $62,8 \pm 6,5\%$ signifikant geringer ($p < 0,05$)

Während Stimulation mit GDF-15 zu einer signifikant verminderten Messbarkeit von Apoptose assoziierten Nukleosomen führt, wird dieser protektive Effekt durch Inhibierung der PI3Kinase mit Wortmannin und LY294002 aufgehoben. Die alleinige Inkubation ischämisch-reperfundierter Zellen mit PI3Kinase Inhibitoren führte zu keiner Zunahme zelltodassoziiierter Ereignisse verglichen mit I/R allein.

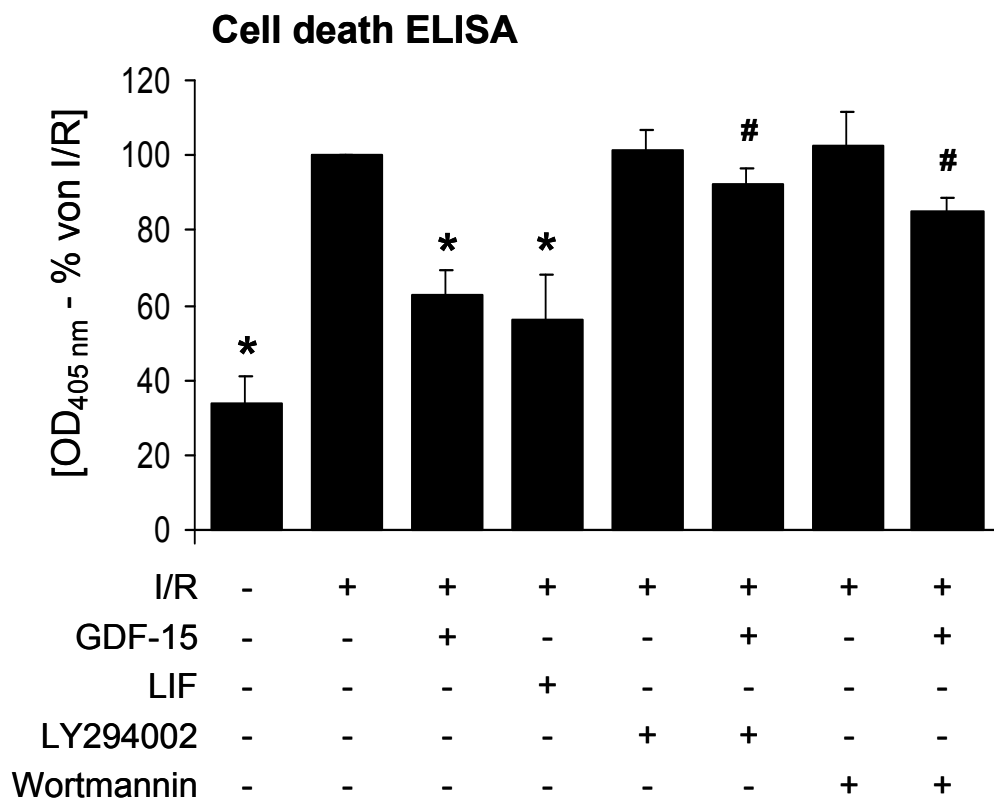


Abbildung 13: Cell-death-Detection-ELISA:

Messung reperfusionsinduzierter Apoptose mit einem Cell Death Detektion ELISA.

Während des gesamten Experiments mit GDF-15/LIF/und PI3 Kinase Inhibitoren stimulierte, und auch unstimulierte Kardiomyozyten wurden nach 3 Stunden simulierter Ischämie und 60 Minuten Reperfusion gemäß den Herstellerangaben in den Cell Death Detection ELISA aufbereitet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 4 unterschiedlichen Experimenten

* $p < 0,05$; # $p < 0,05$ vs. I/R+GDF-15

4.5.2.2 Messung apoptotischer Kardiomyozyten in der TUNEL Färbung

Auch die Anzahl TUNEL positiver Kerne im stieg nach Ischämie (3h) Reperfusion (1h) signifikant an ($3,5 \pm 1\%$ vs. $29,7 \pm 5\%$; $p < 0,05$), während sich diese Erhöhung durch GDF-15 Stimulation signifikant absenken ließ ($8,5 \pm 1\%$; $p < 0,05$). Während Stimulation mit GDF-15 zu einer signifikant verminderten Messbarkeit von TUNEL-positiven Zellkernen führt, wird dieser protektive Effekt durch Inhibierung der PI3Kinase mit Wortmannin und LY294002 aufgehoben. Die alleinige Inkubation ischämisch-reperfundierter Zellen mit PI3-Kinase-Inhibitoren führte zu keiner Zunahme TUNEL-positiver Zellkerne, verglichen mit I/R allein.

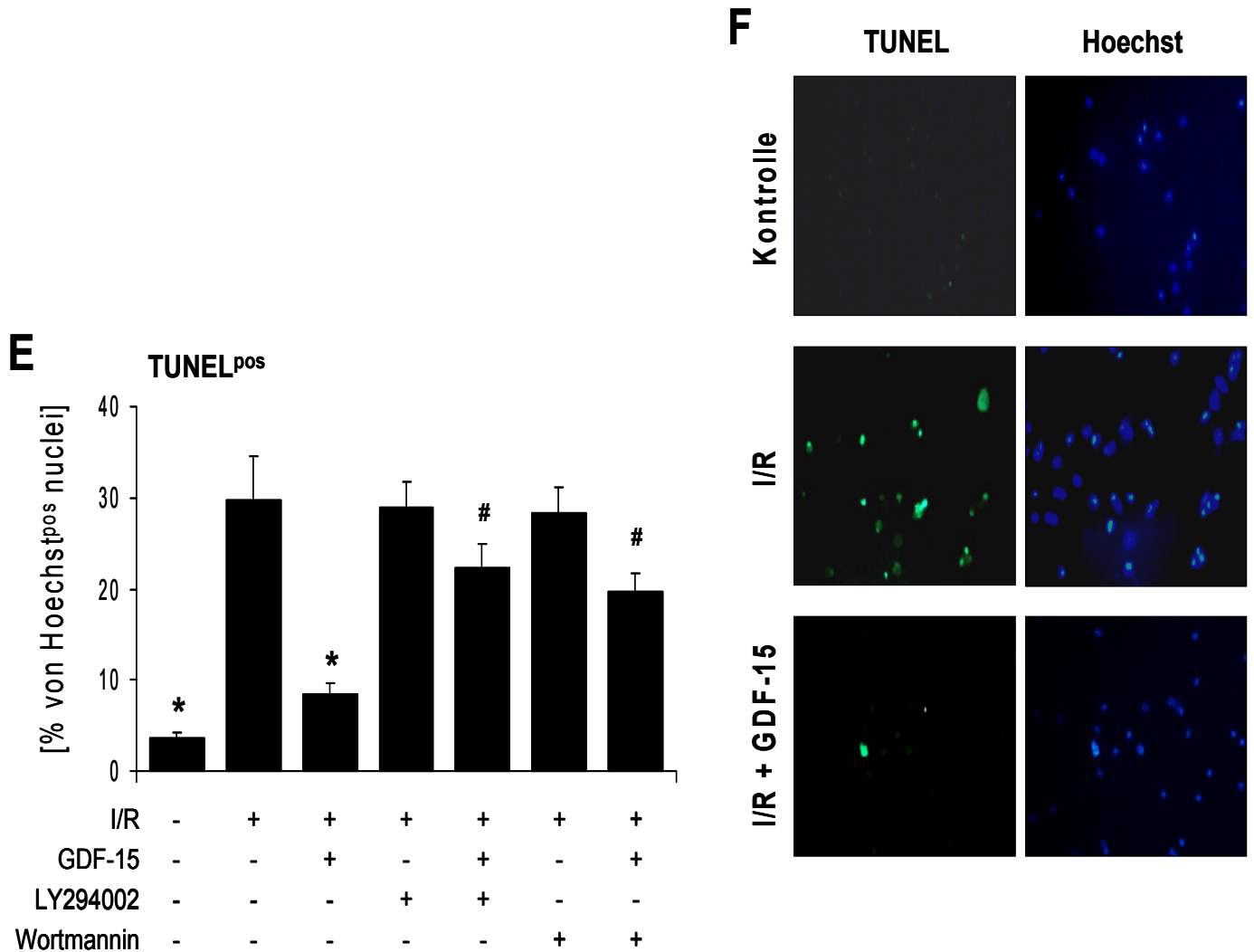


Abbildung 14 : TUNEL-in-Situ-Färbung

E. Statistische Auswertung aller Experimente (n=3) im Säulendiagramm

Die Anzahl DNS-fragmentierter Nuklei ist durch Stimulation mit GDF-15 signifikant geringer, verglichen mit unstimulierten Kardiomyozyten. Doch durch parallele Hemmung der PI3Kinase ist dieser Effekt von GDF-15 blockiert. * $p < 0,05$; # $p < 0,05$ vs. I/R+GDF-15

F. Gezeigt sind beispielhafte Ausschnitte der TUNEL-Experimente in Situ

Die apoptotischen Kerne der Kardiomyozyten sind durch ihre FITC-Fluoreszenz grün zu sehen, während die Fluoreszenz der Hoechst Färbung im UV-Licht blau erscheint. Apoptotische Kerne wurden ausgezählt und in Prozent von allen Kernen ausgewertet.

4.5.2.3 Messung apoptotischer Zellen in der Annexin V FACS Analyse

Während unter Kontrollbedingungen nur etwa $1,7 \pm 0,3\%$ aller gezählten Kardiomyozyten Annexin positiv, aber Propidiumiodid negativ waren (Apoptose, ohne nekrotische Komponente), stieg ihre Anzahl nach simulierter Ischämie Reperfusion signifikant auf $7,7 \pm 2,2\%$, dieser Anstieg war durch gleichzeitige GDF-15 Stimulation signifikant verringert ($3,3 \pm 1,2\%$; $p < 0,05$). Auch hier zeigte sich die Unterdrückbarkeit des protektiven Effektes durch PI3Kinase-Inhibitoren, ohne eine zusätzliche Beeinflussung des I/R assoziierten Zellschadens durch LY294002 allein.

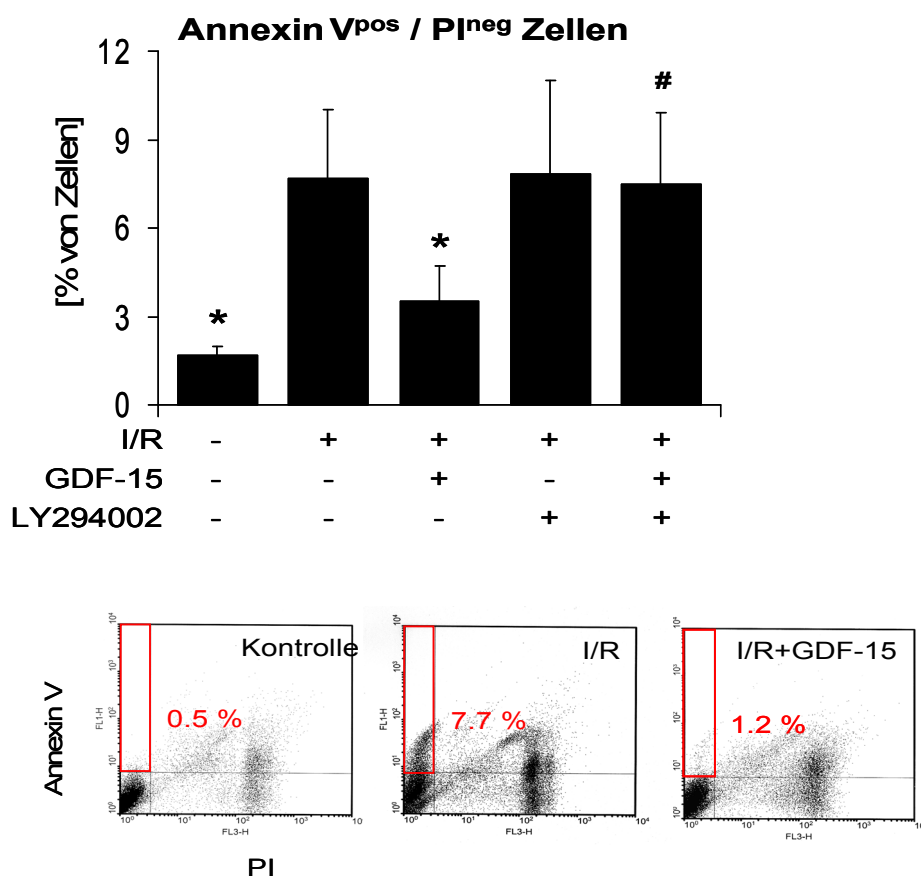


Abbildung 15: Annexin-V-FACS Analyse :

Zu sehen sind typische Ergebnisse einer Annexin FACS Analyse. Die Ordinate spiegelt die Ansteigende Annexin FITC-Fluoreszenz wieder, während auf der Abszisse eine Ansteigende Propidiumiodid Fluoreszenz zu sehen ist. Gewertet wurde die Annexin positiven Zellen (frühe apoptotische Morphologie), die sich zugleich PI-negativ (Mischung aus Nekrose und später Apoptose) zeigten (Gelb unterlegt). Auch hier inhibieren PI3Kinase Hemmstoffe die zellschützenden Wirkungen von GDF-15 bei simulierter Ischämie-Reperfusion ($n=3$). * $p < 0,05$; # $p < 0,05$ vs. I/R+GDF-15

4.6 Bedeutung der protektiven Wirkung von endogenem GDF-15 *in vivo*

Um zu untersuchen inwiefern die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse über die zelltodunterdrückenden Eigenschaften in der Ischämie-Reperfusion auch eine *in vivo* Bedeutung haben, wurden Experimente an einer GDF-15 Knock-out-Maus Population vorgenommen. In diesem Tier-Modell ist das Genom aller Zellen der Mäuse so verändert worden, dass sie nicht mehr in der Lage sind GDF-15 zu produzieren.

4.6.1 Physiologischer Phänotyp der GDF-15 Knockout Maus

GDF-15 Knock- out Mäuse unterscheiden sich unter physiologischen Bedingungen nicht von ihren Wildtyp-Verwandten. Es existieren weder Differenzen in Bezug auf ihren basalen Herzgewicht-zu-Körpergewicht-Quotienten (WT 387 ± 36 Minuten⁻¹; KO 366 ± 25 Minuten⁻¹), noch in Bezug auf ihren mittleren arteriellen Blutdruck (WT 81 ± 9 mmHg; KO 75 ± 5 mmHg) oder ihren maximalen LV Druck (WT 99 ± 8 mmHg; KO 101 ± 5 mmHg) (n=3-5). Wie in Abbildung zu sehen ist exprimieren GDF-15 Knock-outs erwartungsgemäß kein GDF-15 im Myokard.

4.6.2 Infarktgrößenbestimmung

Zunächst wurde untersucht, ob das Fehlen von GDF-15 bei den *Knockout*-Tieren einen Einfluss auf die Entwicklung des I/R-Schadens hat. Hierzu wurden sowohl 13 Wildtyp- als auch 7 *Knockout*-Mäuse wie in Material und Methoden beschrieben operiert. Während in beiden Gruppen die Größe der AAR in Bezug auf den linken Ventrikel vergleichbar ist, zeigte sich, dass GDF-15 *Knockout*-Mäuse ein signifikant größeres infarziertes Areal innerhalb der AAR entwickelten (WT 41%; KO 60% der AAR; p<0,05)

4.6.3 TUNEL-Assay zum Nachweis von Apoptose

In einem Versuch, den größeren Infarkt bei den *Knockout*-Mäusen zu erklären, wurden die Infarktbereiche sowohl der WT- als auch *Knockout*-Gruppe auf Apoptose untersucht. Hierzu wurden Evans-Blue/TTC-gefärbte Herzscheiben aus beiden Gruppen paraffinisiert und mittels TUNEL-Assay auf Apoptose untersucht.

Es lässt sich zeigen, dass die Zunahme der Infarktgröße im GDF-15 Knock-out Modell zurückzuführen ist auf eine vermehrte Zelluläre Apoptose im Infarktangrenzenden Bereich des Myokards. (WT 70 TUNEL positive/1000 Kerne ;KO 400 TUNEL positive Kerne /1000 Kerne; $p < 0,05$).

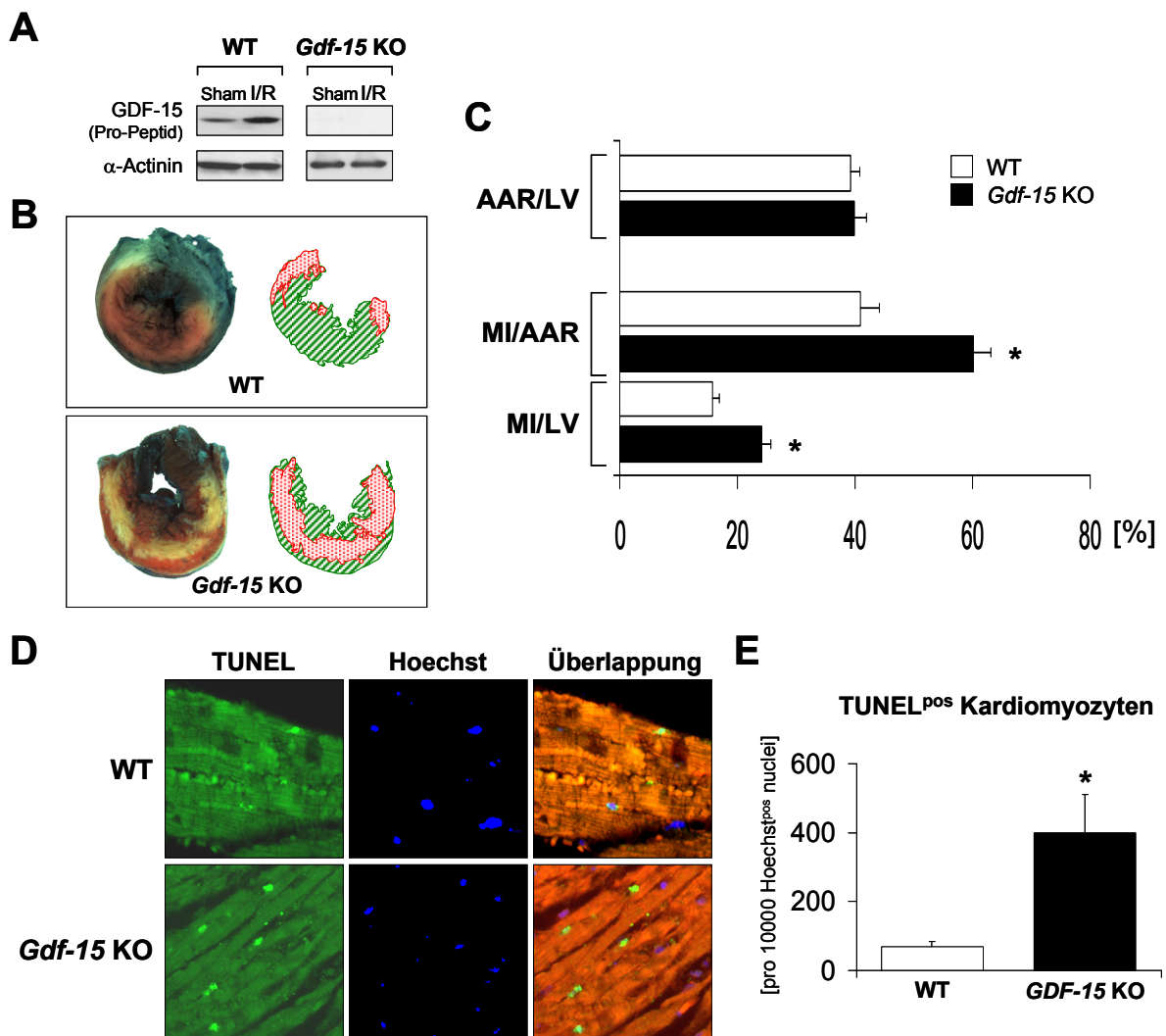


Abbildung 16:

Verschiedene Experimente im GDF-15 Knock-out Modell:

A: *GDF-15 Knockout Mäuse exprimieren erwartungsgemäß kein GDF-15 im Myokard.*

B: *Exemplarische Darstellung der Infarktgrößenbestimmung nach Evans-Blue TTC Färbung. Während sich das nach Reokklusion der LAD mit Evans Blue perfundierte Myokard blau färbt, bleibt das vom Verschluss betroffene Areal farblos (AAR). Mit TTC (rot) lässt sich zwischen vitalem (rot) und avitalem (farblos; Infarkt) Myokard diskriminieren. C: Zusammenschau der statistisch Ausgewerteten Ergebnisse (n=7-8). D: Exemplarische Fluoreszenzbilder zur TUNEL-Hoechst-Alpha-Actinin Trippel-Färbung: Zusehen sind grünlich fluoreszierende TUNEL positive Nuclei und Hoechst positive, blau fluoreszierende Nuclei. In der Überlappung mit rot fluoreszierendem Alpha-Actinin lassen sich apoptotische (grün, blau, innerhalb des actininreichen Zytoplasmas) von nicht apoptotischen Kardiomyozyten (nur blaue Kerne innerhalb von actininreichen Plasma) diskriminieren. Auch lassen sich Nicht-Myozyten erkennen (Blau oder blau-grün, aber außerhalb des actininreichen Plasmas).*

E: *Statistische Auswertung der gesamten Daten. *p<0,05 vs. WT.*

4.7 Autokrine und parakrine Effekte von GDF-15 und Mechanismus der protektiven Wirkung bei Ischämie Reperfusion

4.7.1 GDF-15 aktiviert die Proteinkinase AKT

Es sind verschiedenste zelluläre Signaltransduktionswege bekannt, die das Zellüberleben nach Ischämie Reperfusion beeinflussen. Einer der prominentesten ist der PI3-Kinase-AKT-Signaltransduktionsweg. Über Bindung an ihre spezifischen Rezeptoren lösen Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel Insulin-like-Growth-Factor 1 (IGF-1) eine Aktivierung der PI3-Kinase aus, die zur Produktion von Phospholipiden und nachfolgender AKT-Aktivierung führt.

Kultivierte Kardiomyozyten wurden mit humanem GDF-15 stimuliert und nach verschiedenen Zeitpunkten das Zellprotein geerntet. Nach einer SDS-Page wurde im Immunoblot mit einem phospho-spezifischen Anti-AKT-P-Ser473 (Cell Signalling) der Phosphorylierungsgrad der Kinase AKT detektiert. Als Kontrollantikörper diente ein nur gegen unphosphoryliertes AKT gerichteter Anti-AKT Antikörper.

Es zeigte sich eine signifikante Phosphorylierung der AKT Kinase durch GDF-15 Stimulation bereits nach 15 Minuten (ca. 3,3-fach vs. Kontrolle), die etwa 45 Minuten anhielt, um dann nach 60 Minuten in das Ausgangsniveau zurückzukehren (p<0,05).

A

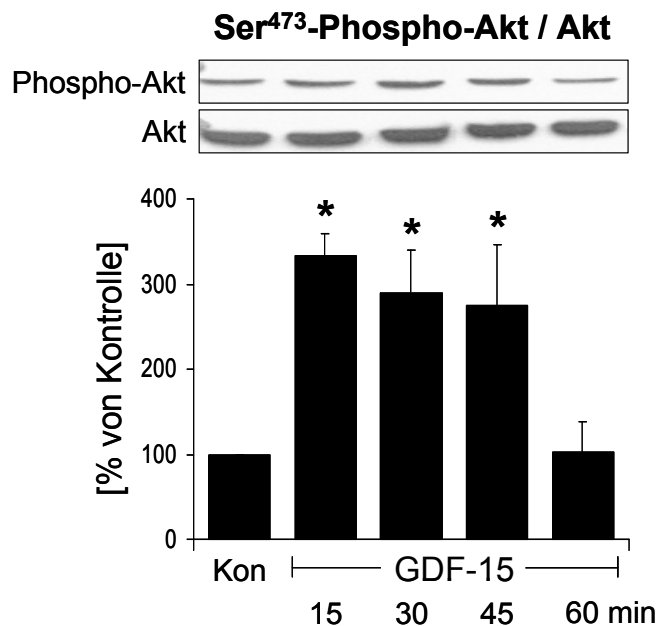


Abbildung 17 :

A: GDF-15 induziert die Phosphorylierung der Proteinkinase AKT in Kardiomyozyten

Kultivierte Kardiomyozyten wurden mit GDF-15 stimuliert und die Proteine im Immunoblot untersucht. 30µg Protein wurden in einer 9% SDS-Page aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Mit einem phospho-spezifischen Anti-AKT Antikörper konnte eine signifikante Phosphorylierung von AKT durch GDF-15 während sich die totale Expression der AKT Kinase nicht veränderte. Eine signifikante Steigerung der Phosphorylierung konnte bereits nach 15 Minuten detektiert werden und hielt etwa 45 Minuten an. * $p < 0,05$

4.7.2 Die anti-apoptotische Wirkung von GDF-15 ist unter anderem durch BAD vermittelt

Ein durch die aktivierte Kinase AKT beeinflusstes Zielprotein ist das zu der BCL Familie gehörende BAD. Dieses Molekül wird normalerweise bei Entzug von Wachstumsfaktoren und verschiedenen apoptotischen Stimuli dephosphoryliert und an die mitochondriale Membran transloziert. Dort hemmt es die schützenden Wirkungen von BCL-2 und BCL-X, die ihrerseits bewirken, dass es zu keiner Auslösung der intrinsischen mitochondrialen Apoptose-Kaskade kommt. Die AKT-abhängige Phosphorylierung von Bad führt zu einer Bindung an 14-3-3 im Zytosol, welche die Translokation unterbindet und so die pro-apoptotische Funktion hemmt.

Ergebnisse

Kultivierte Kardiomyozyten wurden mit humanem GDF-15 stimuliert und das Zellprotein zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen. Nach Auftrennung einer SDS-Page, wurde das Zellprotein mit einem phospho-spezifischen Bad Antikörper untersucht. Als Kontrolle wurde ein Anti-Bad Antikörper verwendet der unphosphoryliertes Bad detektiert. Es zeigte sich eine signifikante Bad-Phosphorylierung durch GDF-15 nach 15 Minuten ($4,9\text{fach} \pm 0,8$ vs. Kontrollen; $p < 0,05$), die nach 60 Minuten abnahm und nach 4 Stunden wieder das Ausgangsniveau erreichte. Auch während der simulierten Ischämie konnte GDF-15-Stimulation eine Phosphorylierung von Bad erzeugen. Interessanterweise führt bereits Ischämie allein zu einer leichten Induktion von Phospho-Bad, die durch GDF-15 noch signifikant gesteigert wird. (Daten nicht gezeigt).

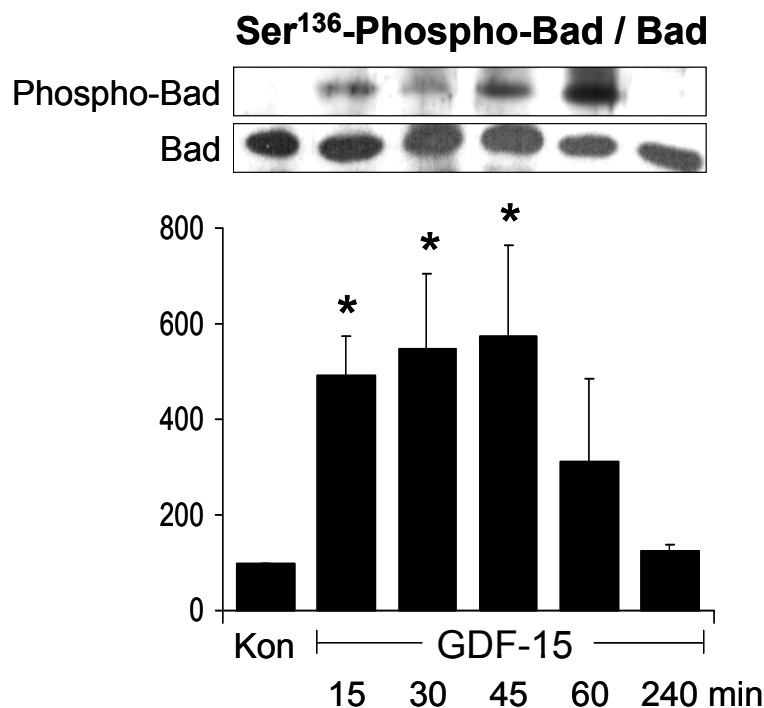


Abbildung 18:

*Nach GDF-15 Stimulation wurden etwa 35 g Zellprotein in die SDS-Page aufgetrennt und mit einem phospho-spezifischen Antikörper im Western Blot untersucht. Als Kontroll-Antikörper diente ein Antikörper, der nur unphosphoryliertes Protein detektiert. * $p < 0,05$*

4.7.3 Humanes GDF-15 aktiviert den PI3Kinase Signaltransduktionsweg in Endothelzellen

Um zu untersuchen, ob GDF-15 auch bei anderen kardialen Zelltypen zu einer AKT-Phosphorylierung führt, wurden humane, venöse umbilikale Endothelzellen (ein etabliertes System für Endothelzellenkultivierung) kultiviert (Promega), für 24 Stunden alle Wachstumsfaktoren entzogen, und dann mit humanem GDF-15 stimuliert.

In Endothelzellen ist die Aktivierung der PI3Kinase AKT Signaltransduktion nicht nur über Bad und andere Moleküle für anti-apoptotische Mechanismen bekannt, sondern auch für die Proliferation und Migrationsfähigkeit förderlich. AKT-aktivierte Endothelien leben länger, proliferieren mehr und besitzen eine deutlich gesteigerte Migrationsbeweglichkeit[112-114]. Insgesamt besitzen sie einen aktivierten, pro-angiogenetischen Phänotyp.

Nach Auftrennung von Zellprotein im SDS-Page, wurde auch hier mit einem phospho-spezifischen Anti-AKT Antikörper die AKT Aktivierung untersucht. Als Kontrolle diente wiederum die totale AKT Expression.

Auch in Endothelzellen zeigte sich eine signifikante AKT Aktivierung nach 15-60 Minuten durch GDF-15 Stimulation, die nach 4 Stunden wieder abgenommen hatte. Inwieweit dies zu einer Endothelaktivierung und zu einem angiogenetischen Phänotyp führt, konnte nicht im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

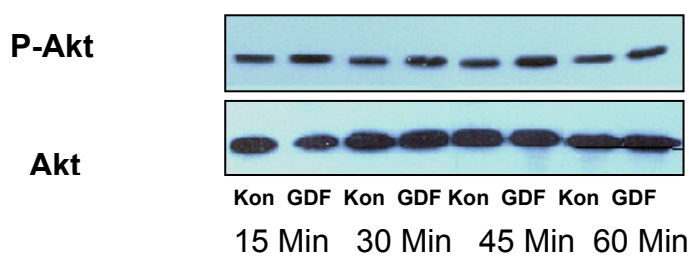


Abbildung 19:

Auch in humanen Endothelzellen führt GDF-15 Stimulation zu einer Aktivierung PI3Kinase abhängiger AKT-Phosphorylierung

Endothelzellen wurden in Wachstumsmedium zu 80% Konfluenz kultiviert, dann 24 Stunden ohne Wachstumsfaktoren auf Basalmedium inkubiert und schließlich mit GDF-15 (3nM) stimuliert („GDF“) und gegen unstimulierte Zellen verglichen („Kon“). Auch hier wurde anschließend die phosphospezifische AKT Expression gegen die totale AKT Expression im Western Blot verglichen.

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit identifiziert das TGF- β Familienmitglied GDF-15 als ein Zytokin, das im Kardiomyozyten *in vitro*, *in vivo* und im Patienten durch Myokardischämie induziert und sezerniert wird und einen endogenen protektiven Faktor darstellt, der sowohl den apoptotischen, wie auch den nekrotischen Zelltod, über eine PI3Kinase-AKT abhängigen Signaltransduktionsweg, verhindern kann.

Die schnellstmögliche Reperfusion von ischämischem Myokardgewebe im Status eines akuten myokardialen Infarktes, in Form einer pharmakologischen Lyse oder einer PTCA ist vordringlichstes Ziel klinischer Therapie. Doch auch wenn die zeitnahe Reperfusion entscheidend für das Überleben des Patienten sein kann, birgt sie auch Risiken und Komplikationen[115]

Neben den späteren Komplikationen der Reperfusionstherapie, wie Restenose und Reinfarkt, ist es auch der durch die Reperfusion selbst erzeugte Zellschaden, der zu Reperfusionsarrhythmien, kontraktiler Dysfunktion und Herzinsuffizienz, und damit zu der weiterhin hohe Letalität der Betroffenen beiträgt.

Erst das genaue Verständnis der Pathomechanismen vor, während und nach einem Myokardinfarkt ermöglicht zukünftig ein noch wirkungsvolleres therapeutisches Eingreifen. So wird mit Nachdruck an Möglichkeiten geforscht, den Untergang von Kardiomyozyten in der myokardialen Ischämie und Ischämie-Reperfusion durch früheres Erkennen und effektivere Therapien, zu unterbinden. Vor allem der streng kontrollierte und regulierte Vorgang des apoptotischen Zelltod verspricht Interventionsmöglichkeiten[116]. Es konnten verschiedenste endogene, wie auch exogene Zellschützende Agenzien und Proteine in Tierversuchen identifiziert werden, deren *in vitro* Effekte viel versprechende therapeutische Optionen verhießen[54]. Nur wenige konnten jedoch die Phase der Tierversuche überstehen und in klinischen Studien eingesetzt werden[117].

Durch das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung/Postkonditionierung, konnte demonstriert werden, dass auch das nicht letal geschädigte, ischämische Myokard selbst in der Lage ist, sich durch verschiedenste Adaptionsmechanismen vor den Auswirkungen zukünftiger, aber auch vergangener Ischämie und Ischämie-Reperfusion zu schützen[54]. Einer der zugrunde liegenden Mechanismen, besteht in der Sezernierung zellprotektiver Liganden, die auf parakrinem und autokrinem Wege

Zellüberlebenspfade, wie die PI3Kinase-AKT-Achse, aktivieren und so den Zelltod unterbinden[57, 60]. Auch GDF-15 konnte als ein neuartiges, im Rahmen der ischämischen Prä-konditionierung freigesetztes Zytokin, identifiziert werden.

5.1 GDF-15 als neuartiges Mitglied der Transforming-Growth-factor beta Familie und Signaltransduktion

Unter den zurzeit etwa 40 bekannten Genen, die Mitglieder der TGF- β Familie kodieren, stellt TGF- β selbst den Prototypen dar. Es wurde erstmalig in den frühen achtziger Jahren beschrieben und seither mit einer Vielzahl von zellulären Regulationsvorgängen in Verbindung gebracht. Während der Embryogenese und auch im adulten Organismus reguliert TGF- β Wachstum, Differenzierung, Morphogenese, Apoptose, Synthese extrazellulärer Matrix und Migrationsverhalten verschiedenster Zelltypen und die Angiogenese[118-120].

Strukturell wird diese Zytokinfamilie in verschiedene Subfamilien unterteilt:

Der Prototyp dieser Zytokinfamilie, TGF-beta selbst, konnte bereits als protektives Protein im Rahmen myokardialer Ischämie und Ischämie-Reperfusion identifiziert werden, wobei die Wirkungen zum Teil über eine Aktivierung der p38MAP-Kinase, oder über die Beeinflussung der Regulation von Matrix-Metalloproteinasen erzeugt werden[121]. Es konnten jedoch auch ungünstige Effekte des TGF-beta, insbesondere im Post-Infarkt Heilungsprozess und in der Hypertrophieentwicklung (Remodelling) gezeigt werden[122]. Eine prolongierte Stimulation des myokardialen Gewebes mit endogenem und exogenem GDF-15 könnte durch das Fehlen dieser deletären Nebeneffekte einen deutlichen Vorteil gegenüber TGF-beta selbst darstellen.

Die Zugehörigkeit der Mitglieder zur TGF- β Familie bezieht sich strukturell vor allem auf den Besitz einer knotenähnlichen Struktur, die aus sechs von insgesamt sieben Cysteinresten der Aminosäurekette gebildet wird. Das Pro-Peptid erleichtert hier die korrekte Faltung der Peptidketten und hemmt durch Bindung an die intrazellulären Vorläufer die Aktivierung bis zur Sekretion. Das Pro-Peptid selbst wird glykosyliert und lässt sich extrazellulär nachweisen. Zwischen den beiden siebten Cysteinresten zweier Monomere bildet sich noch im endoplasmatischen Retikulum ein durch Disulfidbrücken stabilisiertes Dimer aus, welches nach Transport und Spaltung im Golgi-Apparat unmittelbar sezerniert wird.

Diskussion

Seit 1997 wurde das zunächst als Macrophage-Inhibitory-Cytokine-1 bezeichnete Zytokin GDF-15/MIC-1 von der Arbeitsgruppe um Bootcov aus der cDNS aktivierter Makrophagen isoliert und als Mitglied der TGF- β Familie klassifiziert.

Lokalisiert ist es im Genom auf dem kurzen Arm von Chromosom 19, als aus 2 Exons bestehende etwa 38000 Bp lange Sequenz, aus der eine etwa 1250bp lange mRNA transkribiert wird. Es wird ähnlich, wie andere Mitglieder der TGF β Familie, als etwa 308 Aminosäuren großes Precursorprotein synthetisiert, welches neben dem 29 Aminosäuren umspannenden Signalpeptid, ein 167 Aminosäuren großes Pro-Peptid, sowie das 112 Aminosäuren große reife GDF-15 enthält. Auch lässt sich in der Struktur des Proteins, die charakteristische Sieben-Cystein Domäne nachweisen, Die im Falle des GDF-15 80 Aminosäuren umspannt.

Die Bedeutung des Propeptids für die Sezernierung und extrazelluläre Wirkung bei GDF-15 konnte kürzlich weiter aufgeklärt werden. GDF-15 wird neben der reifen prozessierten Form auch als Propeptid enthaltende Precursor Form sezerniert und im Bereich der extrazellulären Matrix über das Propeptid als Anker gespeichert. Über die lokale Prozessierung dieses extrazellulären Depots, kann eine weitere Feinabstimmung der GDF-15 Wirkung und des Eintritts in die Zirkulation, zumindest in verschiedenen Tumorerkrankungen, erfolgen.[123] Auch in den hier präsentierten immunhistochemischen Nachweisen von GDF-15 im Myokard muss davon ausgegangen werden, dass zum Teil auch die unprozessierte Precursor Form nachgewiesen wurde.

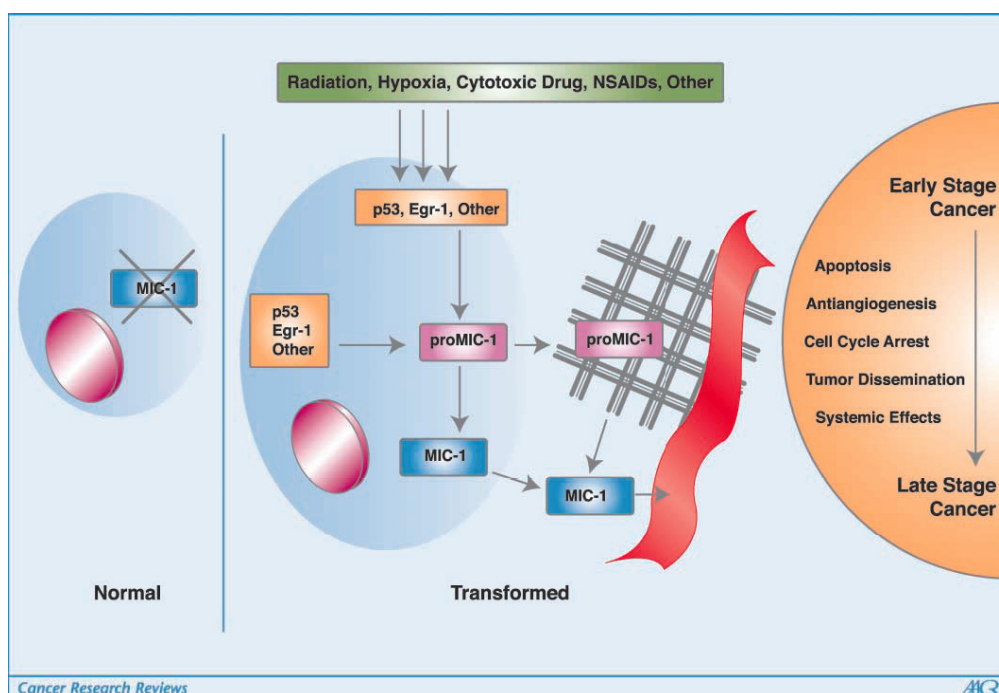


Abbildung aus[123]. Hinweis: GDF-15 entspricht MIC-1

Diskussion

Erst kürzlich konnte eine Verbindung zwischen der zellulären GDF-15 Induktion und kardiovaskulären Erkrankungen von Brown et al. 2002 hergestellt werden. Ergebnisse der Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass in Frauen erhöhte GDF-15-Serumspiegel als Risikoindikator für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse zu werten sind[76]. Doch die zelluläre Herkunft, die Regulationsmechanismen und die Auswirkungen gesteigerter GDF-15 Expression blieben ununtersucht. Man vermutete lediglich, dass GDF-15, als im Rahmen der Makrophagenaktivierung erstmals beschriebenes Zytokin, genau aus diesen, im atherosklerotischen Prozess beteiligten Fresszellen stammt.

Über die Regulation der GDF-15 Genexpression ist unterschiedliches bekannt.

Der GDF-15 Promotor weist Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren SP1, SP2 und AP-2, AP-4 auf, sowie für die Transkriptionsfaktoren p53, AP-1, und EGR-1[79-82, 84].

Letztere verdeutlichen die Induktion von GDF-15 im Rahmen von zellulärem Schaden und Stress unterschiedlicher Genese. Denn sowohl p53, wie auch AP-1 und EGR-1 sind dafür bekannt, dass sie im Rahmen von Zell- und DNS Schäden unterschiedlicher Genese, sowie auch durch oxidativen Stress und Ischämie die Transkription ihrer Zielgene aktivieren können[124]. Auch spielen sie im Rahmen von Zellüberleben und Zelltod eine bedeutende Rolle[85-87]. Passend zu diesen Befunden konnten so erhöhte GDF-15 Spiegel in nekrotischen Arealen nach Leberschäden[88], sowie nach Strahlenschäden, Intoxikationen, Kryoschädigungen in Neuronen, Anoxie und Behandlung mit Inhibitoren der Cyclooxygenase, wie Acetylsalicylsäure und Indomethacin gefunden werden[78, 80, 81, 125].

In der Schwangerschaft finden sich sowohl im Serum, wie auch in der Plazenta hohe GDF-15-Spiegel[126]. So scheint es nicht verwunderlich, dass zum einen Involvierungen in embryonales und osteogenisches Wachstum und zu anderen in die hämatopoetische Entwicklung nachgewiesen wurden. Auch Hromas et al 1997 wiesen proliferationshemmende Wirkungen von GDF-15 auf primitive hämatopoetische Progenitorzellen nach, ebenso wie die Knorpelbildung induzierenden Funktionen, während der Knochenbildung. Niedrige GDF-15 Serumspiegel in der Schwangerschaft konnten erst kürzlich mit der Schwangerschaftsabbruchwahrscheinlichkeit im ersten Trimester korreliert werden, was die Wichtigkeit dieses Zytokins in physiologischen Entwicklungs- und Differenzierungs-Vorgängen, wie möglicherweise auch der Angiogenese

unterstreicht[93]. An dieser Stelle könnten die auch hier vermuteten Wirkungen des GDF-15 auf Endothelzellen eine Rolle im Kontext spielen.

Aber auch in verschiedenen Tumorerkrankungen wurden Funktionen von GDF-15 untersucht und nachgewiesen. So wurde es in Neoplasien der Prostata, Lungen, Brust und Pankreas, sowie in Karzinomen des Gastrointestinaltrakts überexprimiert gefunden. In den meisten Studien konnte eine anti-tumorigene Wirkung in vitro und in vivo nachgewiesen werden, die sowohl auf eine Hemmung des G1-Zellzyklus zurückzuführen war, wie auch auf eine pro-apoptotische Wirkung auf Tumorzellen[89, 90].

Im Gegensatz dazu stehen einige Wirkungen, die vielmehr auf eine trophische, zellprotektive Funktion schließen lassen. Abhängig scheinen diese Unterschiede in der Wirkung von GDF-15 von der Aktivierung verschiedener Rezeptor-Subtypen innerhalb der TGF- β Rezeptoren zu sein, die zu einer nachfolgenden Aktivierung jeweiliger SMAD-Moleküle oder aber SMAD unabhängiger Signaltransduktionspfade führt.

Die Aktivierung eines TGF- β Rezeptors, einer Serin/Threonin-Kinase, ist prinzipiell die Dimerisierung zweier Rezeptorsubtypen, der verschiedenen TGFR I und TGF β RII Untergruppen, erforderlich.

In Säugetieren existieren etwa 7 verschiedene Formen des TGF- β -Rezeptors I und 5 des kontinuierlich aktiven TGF- β -Rezeptors II. Über die Bindung eines TGF- β -Dimers werden beide Rezeptoren in großer Nähe lokalisiert, so dass der TGFRII den TGFRI phosphorylieren und damit aktivieren kann.

Die aktivierte Typ 1 Rezeptor-Kinase rekrutiert verschiedene Kofaktoren, die als R-SMAD's bezeichnet werden und durch Bindung an den aktivierten Rezeptor phosphoryliert werden. TGF-beta aktivierte Rezeptoren verwenden charakteristischerweise SMAD's 2 und 3, während die SMAD's 1,5 und 8 durch BMP's verwendet werden. Aktivierte R-SMAD's komplexieren im Zytosol mit SMAD 4, werden in den Kern transloziert, wo der Komplex verschiedene Gene transkriptionell reguliert. Die DNS-R-SMAD Interaktion wird hierbei durch SMAD 4 stabilisiert und die Transkription initiiert. Diese Signaltransduktion ist hochkomplex reguliert. Während bereits die Ligand-Rezeptor Interaktion durch Regulationsproteine gesteuert wird, existieren auch inhibitorische SMAD-Proteine, die die Feinmodulation der Signaltransduktion vornehmen.

Einige Mitglieder der TGF- β Familie benutzen darüber hinaus einen anderen Rezeptortypus, der sich aus einem heterodimeren Komplex aus einer Rezeptor-Tyrosin-Kinase und einem Glycosylphosphoinositol-gekoppeltem Alpha-Rezeptor bildet[127]. Ob auch die Effekte einer GDF-15 Stimulation über die beschriebenen TGF-beta Signaltransduktionswege verlaufen, ist noch nicht abschließend geklärt und ist im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterführend untersucht worden. Die Unabhängigkeit von der SMAD Signaltransduktion ist insofern plausibel, weil auch andere divergente Mitglieder, wie GDNF und Persephin, aber auch TGF-beta selbst, die PI3Kinase unabhängig von SMAD's aktivieren können[125].

So konnte nachgewiesen werden, dass GDF-15, welches im ZNS hauptsächlich in den Epithelien des Plexus Choroideus gebildet und in den Liquor sezerniert wird, sowohl intoxikierte dopaminerge Mittelhirnneuronen schützen kann, wie auch die Transmitteraufnahme in serotonerge Rapheneuronen steigert[78]. In der gleichen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Stimulation mit GDF-15 Kleinhirnneuronen vor dem apoptotischen Zelltod schützen kann. Dieser protektive Effekt war über eine Aktivierung des PI3K-AKT-GSK3 β Überlebenspfades und zum zweiten durch eine Hemmung der ERK1/2 Aktivierung vermittelt[125]. Über welche exakten extrazelluläre Rezeptoren, GDF-15 seine Wirkungen vermittelt, muss noch untersucht werden

5.2 Die gesteigerte GDF-15 Expression ist eine Antwort des Kardiomyozyten auf zellulären Stress *in vitro* und *in vivo*

Erstmalig konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *in vitro* und *in vivo* ischämische und ischämisch reperfundierte Kardiomyozyten GDF-15 exprimieren und sezernieren. Diese Induktion im Kardiomyozyten ist abhängig von redox-sensitiven Regelkreisen und der Formation von endogenem Stickstoff-Monoxid. Darüber hinaus lässt sich zeigen, dass diese Bildung von GDF-15 einen endogenen zellprotektiven Mechanismus in Myokard darstellt, der über eine Aktivierung des PI3-Kinase-AKT Signaltransduktionssachse in die Entscheidung über Zellüberleben und Zelltod eingreift.

Um die verantwortlichen Mechanismen und Regelkreise der ischämie- und ischämie-reperforationsbedingten GDF-15 Induktion zu untersuchen, wurde ein *in vitro* Modell verwendet, in dem mit kultivierten isolierten Kardiomyozyten solche Bedingungen

simuliert werden können. In einem solchen Modellsystem lassen sich letztendlich viele Einflussparameter, wie Hämodynamik, humorale und parakrine Einflüsse anderer Organe und Zelltypen ausschalten.

Es konnte nun nachgewiesen werden, dass simulierte Ischämie und Ischämie-Reperfusion in Kardiomyozyten zu einer signifikanten Expressionssteigerung des GDF-15 Proteins führt. Auch ließ sich reifes, sezerniertes GDF-15-Peptid im Zellüberstand nachweisen, eine Tatsache, die autokrine und parakrine Effekte des Zytokins im myokardialen Verband vermuten ließ. Nun stellte sich die Frage, über welchen molekularen Induktionsmechanismus im Rahmen der Ischämie-Reperfusion, GDF-15 im Kardiomyozyten reguliert wird.

5.3 Regelkreise und Mechanismen der GDF-15 Induktion

Vor allem in der Reperfusion, aber auch in geringerem Maße in der Ischämie spielt der hohe intrazelluläre oxidative und auch nitrosative Stress eine bedeutende Rolle[16, 19, 124, 128]. Sauerstoffradikale aus der mitochondrialen Atmungskette und verschiedenen Enzymsystemen und Stickstoffmonoxid, synthetisiert von konstitutiven und induzierbaren NO-Synthasen, schädigen die Zellen durch Alteration und Oxidation wichtiger zellulärer Strukturen, wie Proteinen, DNS und Lipiden. Erreicht dieser Radikalüberschuss einen kritischen Level, kann er sogar letztendlich zum Zelltod führen, indem er die mitochondriale Atmungskette blockiert und über eine mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c proapoptotisch wirkt.

Sauerstoff- und Stickstoffradikale formen zusätzlich intrazellulär das extrem kurliebige Peroxynitrit, welches in hohen Dosen zytotoxisch wirkt, in geringeren Dosen, durch das Wegfangen der Sauerstoffradikale, jedoch auch zellprotektiv wirken kann[108].

Vom Stickstoffmonoxid ist weiterhin bekannt, dass er die lösliche Guanylatzyklase aktivieren kann und über die Erhöhung von cGMP die Genexpression verändert[107]. Aber auch cGMP unabhängige Veränderungen der Genexpression durch NO sind bekannt, wobei vor allem so genannte Redox-sensitive-Transkriptionsfaktoren, wie auch AP-1 eine Rolle spielen.

In der Arbeit von Albertoni et al konnte bereits gezeigt werden, dass GDF-15 durch Anoxie, jedoch unabhängig gängiger Stress-Sensoren wie p53 aber vor allem HIF-1 in Glioblastomzellen induziert wird[92].

Wir spekulierten daher, dass die im Rahmen der Ischämie Reperfusion erhöhten Stickstoffmonoxid und Radikalspiegel an der GDF-15-Genregulation beteiligt sind.

Diskussion

Es ließ sich demonstrieren, dass sowohl direkte Stimulation mit subtoxischen Dosen des NO-Donors SNAP, wie auch die direkte Stimulation mit Peroxynitrit zu einer gesteigerten GDF-15 mRNA und Protein-Expression in kultivierten Kardiomyozyten führte. Das selektiv die lösliche Guanylatzyklase aktivierende 8 *pCPTcGMP* konnte jedoch keine GDF-15 Induktion hervorrufen. Somit postulieren wir eine GDF-15 Genaktivierung, die über radikalabhängige, cGMP-unabhängige Mechanismen induziert wird.

Weiterhin wurde die Frage überprüft, inwieweit endogenes, über NO-Synthasen synthetisiertes Stickstoffmonoxid auch GDF-15 Expression beeinflusst. Hierzu wurden Kardiomyozyten mit den die NOS2 induzierenden Zytokinen Interferon γ und Interleukin-1 β stimuliert. Es zeigte sich eine indirekte, weil über Blockade der NO-Synthasen und *Peroxynitrit-Scavenging* reversible, Induktion von GDF-15 durch vermehrte Expression endogener NOS2 und damit verbundener stark erhöhter NO-Verfügbarkeit.

Des Weiteren ließ sich demonstrieren, dass auch der durch simulierte Ischämie-Reperfusion induzierte GDF-15 Expressionsanstieg in Kardiomyozyten sensibel auf eine Hemmung von zellulären NO-Synthasen, sowie auf ein *Scavenging* von Peroxynitrit ist. Dieser Befund bietet einen starken Hinweis auf die Regulation von GDF-15 in der Ischämie-Reperfusion durch Stickstoffmonoxid-Peroxynitrit abhängigen Signaltransduktionswege. Ob in diesem auch Modell die erwähnten Transkriptionsfaktoren AP-1 oder EGR-1 eine bedeutende Rolle spielen, bleibt noch offen.

Interessanterweise führt Stress auch in Endothelzellen zu einer Erhöhten NO-Verfügbarkeit, da vor allem durch Scherstress die eNOS aktiviert wird. Auch Sauerstoffradikale werden in diesem Kontext erzeugt. Vor allem stammen sie aus Enzymen wie der NADPH-Oxidase und der endothelialen Xantinoxidase. Inwieweit dies die hohen GDF-15 Serumspiegel in den Patienten mit hohem kardiovaskulärem Risiko bedingt oder auch für die GDF-15 Expression in Endothelien im Infarkttrandbereich verantwortlich ist muss noch determiniert werden.

5.4 Nach Ischämie und Ischämie-Reperfusion *in vivo* bilden Kardiomyozyten vermehrt GDF-15

Zwei Maus-Modelle wurden etabliert, um die GDF-15 Expression *in vivo*, sowie Transkriptions- und Translationsaktivität zu untersuchen.

Das erste Modell stellt einen chronischen Myokardinfarkt der Vorderwand dar. Im zweiten Maus-Modell wurde das Verfahren derart modifiziert, dass die Perfusionsunterbrechung ebenso kontrolliert reversibel durchgeführt werden konnte. So ließ sich eine Reperfusionstherapie, wie im klinischen Alltag mittels PTCA, simulieren. Und es konnte im Weiteren untersucht werden, inwieweit sich myokardiales Gewebe im ischämischen oder ischämisch-reperfundierten Areal von Gewebe unterschied, welches sich im nicht-ischämischen Bereich des Herzens befand.

In diesem Versuchsaufbau ließ sich zeigen, dass sowohl chronische Ischämie, wie auch Ischämie und anschließende Reperfusion zu einer signifikanten und anhaltenden GDF-15 Induktion im temporären oder dauerhaft ischämischen Areal führte. Auf mRNS Ebene ließ sich bereits nach 1 Stunde nach experimenteller Ischämie-Reperfusion eine gesteigerte GDF-15 Expression in der *Real-time* PCR detektieren, die sowohl in diesem Modell, wie auch im chronischen Infarkt auch nach 7 Tagen noch Bestand hatte.

Auch auf Proteinebene zeigten sich mit leichter zeitlicher Karenz nach etwa 5 Stunden im ischämischen, wie auch im ischämisch reperfundierten Myokardgewebe signifikant höhere GDF-15 Spiegel, verglichen mit schein-operierten Herzen. Eine transiente GDF-15 Induktion im nicht-ischämischen Bereichen des linken Ventrikels ließ sich lediglich kurzfristig nachweisen und war im Ausprägungsgrad in den vorliegenden Daten gering. Dies unterstreicht die Tatsache, dass der Induktionseffekt mehr auf die Ischämie per se und nicht auf eine neurohumorale Aktivierung zurückzuführen ist. Zusätzlich könnte jedoch auch eine durch erhöhte Wandspannung (Stretch) induzierte zusätzliche Expressionsinduktion von GDF-15 denkbar sein.

In einer kürzlich publizierten Arbeit von Xu et al konnte weiterhin GDF-15 als neuer antihypertropher Faktor identifiziert werden, der im adulten Herzen unter Bedingungen induziert wird, die im Myokard die Entstehung von kardialer Hypertrophie und konsekutiver dilatativer Herzinsuffizienz bewirken. GDF-15

Diskussion

überexprimierende Mäuse zeigten sich dort partiell resistent gegenüber druckinduzierter Hypertrophie, wohingegen GDF-15-Knock-out Mäuse eine verstärkte druckinduzierte Hypertrophie aufwiesen. GDF-15 Überexpression in kultivierten Kardiomyozyten antagonisierte gleichsam die Hypertrophie induzierende Wirkung von Katecholaminen und Angiotensin II. Die erörterten kardioprotektive Wirkungen schienen dort abhängig von einer intakten TGF-Rezeptor-SMAD-Interaktion zu sein.

Die experimentellen Daten deuten daraufhin, dass zum einen bereits frühzeitig nach dem schädigenden Ereignis der GDF-15 Spiegel im Gewebe ansteigt und persistierend erhöht bleibt. Somit sind Effekte im myokardialen Zellverband sowohl im kurzfristigen, wie auch im langfristigen Kontext denkbar. Die immunhistologische Untersuchung zeigte, dass neben den Endothelien vor allem Kardiomyozyten im Nekroserandbereich für die vermehrte Produktion des GDF-15 verantwortlich sind. In scheinoperiertem Myokardgewebe ließ sich nur schwach GDF-15 Expression in Kardiomyozyten und Endothelzellen nachweisen. Bereits nach 4 Stunden zeigte sich, dass in geringem Maße ischämische Endothelien, aber vor allem ischämische, aber noch vitale Kardiomyozyten vermehrt GDF-15 produzieren und in den Interzellularraum sezernieren.

Auch 24 Stunden nach diesem Akutgeschehen sterben Myozyten im Infarkt- und Infarkttrandbereich ab. Auch hier sind die Mechanismen kontrovers[1, 2, 92]. Vor allem die induzierbaren NO-Synthasen beginnen im Kardiomyozyten mit einer geringen zeitlichen Latenz größere Mengen Stickstoffmonoxid, aus L-Arginin Stickstoffmonoxid und L-Citrullin synthetisiert freizusetzen[108]. Stickstoffmonoxid ist ein reaktionsfreudiges, sehr gut membrangängiges Gas, mit kurzer Halbwertszeit. Es hat Einfluss auf viele zelluläre Vorgänge wie Zellwachstum und Überleben, Hemmung der Plättchen und Neutrophilenaggregation und Kontraktion, fördert Koronardilatation und Angiogenese. Auch kann NO über Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase und nachfolgende Erhöhung der cGMP Spiegel, aber auch durch seine radikalbildenden Eigenschaften die Transkription verschiedener Gene verändern. Dieser Effekt wird unterstützt, durch infiltrierende Leukozyten und Makrophagen, die ebenfalls Sauerstoffradikale erzeugen können. Somit hält auch der oxidative Stress und die Entstehung toxischer Intermediate weiter an, die für den weiteren Zelltod von Kardiomyozyten und die Expansion des Infarktareals mit verantwortlich sind[124, 129-132]. Auch können die Expressionssteigerung von TNF-

alpha und FAS-Ligand über den extrinsischen Apoptoseweg für weiteren Zelltod verantwortlich sein. Die Aktivierung ihrer Rezeptoren und der Caspase 8 kann über die Spaltung von Bid wiederum eine Querverbindung zum intrinsischen Apoptoseweg herstellen[130, 132].

5.5 GDF-15 ist im humanen Infarktgewebe vermehrt exprimiert

Zunächst konnten wir anhand von Autopsiematerial von an akutem Myokardinfarkt verstorbenen Patienten, im Vergleich zu an nicht kardiovaskulären Erkrankungen Verstorbenen zeigen, dass es im humanen Infarktgewebe zu einer Induktion des GDF-15 Proteins kommt. Diese Expressionssteigerung ist bereits nach weniger als 24 Stunden signifikant. Selbst 9-15 Tage nach Myokardinfarkt bleibt diese Induktion noch präsent, so dass sich vermuten lässt, dass GDF-15 nicht nur im akuten Infarkt, sondern auch im Post-Infarkt-Heilungsprozess eine Rolle spielt.

Die vorliegenden, histologischen Daten lassen weiterhin vermuten, dass nicht oder nicht ausschließlich die Gefäße für die erhöhten GDF-15 Serumspiegel bei Infarkttrisikopatienten verantwortlich sind, wie von Brown et al vermutet wurde, sondern vor allem das minderdurchblutete, kompromittierte Myokard selbst ein maßgeblicher Ursprung ist. Denn auch vor einsetzen eines akuten Gefäßverschlusses und prolongierter Ischämie, können signifikante, auch lediglich temporäre Gefäßeinengungen vorliegen und sich die resultierende Minderdurchblutung von Myokardgewebe durch Angina Pectoris ankündigen. Inwieweit GDF-15 wie bereits angedeutet in der Lage ist, einen geeigneten Biomarker und Risikoindikator darzustellen, der im klinischen Alltag Aussagen über den kardialen Versorgungszustand und die weitere Prognose des Patienten zu ermöglichen muss erst in weiteren Experimenten untersucht werden. An verschiedenen Patientenpopulationen könnten mit einem GDF-15 Radioimmunoassay GDF-15 Serumwerte ermittelt und gegenüber etablierten Markern und klinisch anamnestischen Daten in ihrer klinischen Wertigkeit und prognostischen Aussage verglichen werden. Durch diese Eigenschaften ist GDF-15, wie kürzlich gezeigt werden konnte, als neuartiger Biomarker in der Lage, ähnlich wie etablierte Marker, (Troponin T und I, NT-Pro BNP, CRP) Risikopatienten mit akutem Koronarsyndrom zu charakterisieren und weitere prognostische Aussagen durch die Höhe der Serumspiegel zu ermöglichen[133]. So ist es bald denkbar dass in einer

Notaufnahme Situation, auch über die Bestimmung von Serum-GDF-15 eine Risikostratifizierung von Patienten vorgenommen werden kann.

5.6 Zytoprotektive Eigenschaften von GDF-15 in der myokardialen Ischämie Reperfusion. *In vitro* Ergebnisse

Da in den histologischen Untersuchungen ischämische Kardiomyozyten als eine der Hauptquellen für die Induktion und Sezernierung von GDF-15 identifiziert werden konnten, sollte im *in vitro* Modell, die exakten Auswirkungen einer GDF-15 Induktion in der Ischämie und Ischämie Reperfusion näher untersucht werden.

Hierfür wurden isolierte Kardiomyozyten mit GDF-15 stimuliert und anschließend simulierter Ischämie-Reperfusion ausgesetzt. Es ließ sich zeigen, dass in der ischämischen Phase, in der der Zellschaden vordringlich durch einen nekrotisch bedingten Untergang von Myozyten gekennzeichnet ist, durch GDF-15 ein deutlich geringerer Verlust der Plasmamembranstabilität messbar war, als in vergleichbaren Kontrollzellen.

Da die Reperfusion durch eine Mischung aus nekrotischem, aber vor allem apoptotischen Zelltod geprägt wird, wurde nun in drei methodisch divergent konzipierten Assay untersucht, ob GDF-15 als ein anti-apoptotischer Faktor in der Reperfusion fungiert.

Während Ischämie allein zu keiner messbaren Zunahme von Apoptose führte, stieg nach Reperfusion die Anzahl apoptotischer Kardiomyozyten sowohl im Anti-Histon-ELISA, in TUNEL-Assay und auch in der Annexin-V-FACS Analyse an. Gleichzeitige Stimulation der Kardiomyozyten mit GDF-15 hingegen, bewirkte einen signifikant geringeren Anstieg apoptotischer Ereignisse nach simulierter Ischämie-Reperfusion. Diese Daten lieferten Hinweise, dass GDF-15 Stimulation fähig ist, Kardiomyozyten vor den zellschädigenden Auswirkungen der Ischämie und der Ischämie-Reperfusion zu schützen und so auch direkte autokrine Auswirkungen der erhöhten GDF-15 Spiegel im ischämischen Myokard denkbar sind. Die in diesen Experimenten eingesetzten Konzentrationen von GDF-15 (20ng/mL) sind insbesondere als pathophysiologisch relevant zu bezeichnen. Während normales menschliches Serum weniger als 0,5ng/mL GDF-15 enthält, sind unter Bestimmten Konditionen Steigerungen um den Faktor 30 beschrieben (Schwangerschaft, bestimmte

Krebserkrankungen). Weiterführende Experimente der AG Wollert an Patienten mit akutem Myokardinfarkt zeigten, dass ihre Serumspiegel auf bis zu 10ng/mL ansteigen. Bedenkt man die Annahme, dass die Quelle für diese GDF-15 Expression das kompromittierte Myokard ist, sind auf myokardialer Gewebeebene lokal noch höhere GDF-15 Spiegel denkbar.

5.7 GDF-15 Knock-out Modell

GDF-15 Stimulation schützt Kardiomyozyten vor den Auswirkungen der Ischämie-Reperfusion

Aufgrund der Sezernierung von reifem GDF-15 durch subletal geschädigte Kardiomyozyten ließen sich autokrine und parakrine Effekte innerhalb des myokardialen Zellverbandes vermuten. Und aufgrund unserer *in vitro* Ergebnisse wurde diese Hypothese nun in *in vivo* Modellen weiter untersucht. GDF-15 wurde bereits in einigen Arbeiten mit dem Zelltod und Zellüberleben unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen in Verbindung gebracht. So konnten pro-apoptotische Wirkungen auf verschiedene kanzeröse Zelllinien gezeigt werden, ebenso, wie zytoprotektive Wirkungen auf Neuronen[89, 90, 134]. Es war daher von Interesse, die Auswirkungen der hohen endogenen GDF-15 Proteinspiegel im Interstitium während der Ischämie Reperfusion auf das Zellüberleben zu untersuchen.

Um die *in vivo* Relevanz von GDF-15 weiter zu evaluieren und um zu klären, ob das im Akutereignis sezernierte GDF-15 zeitnah genug produziert wird, um seine zellschützenden Eigenschaften zu entfalten, wurde in weiterführenden Experimenten der Arbeitsgruppe ein GDF-15 Knock-out Maus Modell verwendet. Es bestand aus Wild Typ Mäusen und artgleichen GDF-15-Knock out Mäusen. Diese Maus-Populationen wurden dankenswerter Weise von Dr. Se-Jin Lee (Hopkins-University) zur Verfügung gestellt, sie waren genetisch so verändert, dass ihre Zellen nicht in der Lage waren endogenes GDF-15 zu bilden. Auch bei diesen beiden Gruppen wurde Ischämie Reperfusion durchgeführt und anschließend die Infarktgröße und die Anzahl apoptotischer Zellkerne analysiert.

So ließ sich im direkten Vergleich untersuchen, ob auch endogenes GDF-15 im Kontext myokardialer Ischämie und Ischämie Reperfusion eine protektive Funktion wahrnimmt. Es zeigte sich, dass GDF-15 defiziente Tiere signifikant größere Infarkte entwickeln, als Wildtyp-Mäuse. Und dass GDF-15 defiziente Mäuse eine größere Zahl apoptotischer Zellkerne im infarktangrenzenden Myokardareal zeigten, welches wiederum mit einer TUNEL/Hoechst Färbung untersucht wurde. Damit konnte experimentell bewiesen werden, dass endogenes GDF-15 als ein zellschützendes Agens fungiert, welches die Infarktgröße limitiert.

Dies unterstreicht die funktionelle Relevanz und die in vivo Bedeutung von endogenem GDF-15 Protein für das Zellüberleben und die Infarktgröße in der akuten Ischämie Reperfusion. Ob auch im post-Infarkt Heilungsprozess (*Remodelling*) GDF-15 eine Rolle spielt, wird nun weiter untersucht.

5.8 Mechanismen der zytoprotektiven Wirkung von GDF-15 auf Kardiomyozyten während der Ischämie Reperfusion

Verschiedene Zellüberlebenspfade sind in der Ischämie und Ischämie-Reperfusion dafür bekannt, durch ihre Aktivierung und darauf folgende Initiierung protektiver und überlebensfördernder Kaskaden, unterschiedliche Zellen vor dem Zelltod zu schützen. Defekte in ihrer Funktion führen oft zu gravierenden Störungen der Gewebehomöostase, Überaktivität nicht selten zur kanzerösen Zellentartung[54].

Die PI3Kinase ist ein im Säugetierherzen vielfach beschrieben und untersuchtes membranständiges Enzym. Die Aktivierung dieses Enzyms durch rezeptorgekoppelte Tyrosinkinasen und darauf folgende Produktion von Phospholipiden initiiert eine Aktivierung verschiedener weiterer Kinasen, die direkt oder indirekt das Zellüberleben beeinflussen. Ein wichtiges *Downstream* Ziel der PI3-Kinase ist die Proteinkinase AKT, deren Aktivierung abhängig von über die PI3-Kinase produzierten Phospholipiden ist, die so genannte Pleckstrin-Homologe-Träger, wie AKT selbst und AKT phosphorylierende Kinase an Plasmamembranen rekrutieren, wo sie aktiviert werden.

AKT Aktivierung ist in Kardiomyozyten mit einem zellschützenden, hypertrophen Phänotyp beschrieben, der auch vor den Auswirkungen der Ischämie Reperfusion bewahrt[70, 98, 135, 136]. Vor allem über die AKT-abhängige Phosphorylierung des

Diskussion

BH₃ Peptids Bad aus der BCL-Familie greift die PI3-Kinase direkt in den apoptotischen, aber auch nekrotischen Zelltod ein[39]. Denn wie bereits in der Einleitung geschildert, determinieren die Integrität der mitochondrialen Membran und die Verfügbarkeit von energiereichem ATP die Form des Zelluntergangs in der Ischämie und Ischämie Reperfusion. Phosphorylierung des Bad Peptids führt zu einer Verankerung des Proteins an 14-3-3 in Zytosol und einer Verringerung des Cytochrom c Ausstoßes aus dem intermembranösen Spalt der Mitochondrien. Dieser Ausstoß kann sowohl für die Auslösung eines nekrotischen Ereignisses oder bei Verfügbarkeit von ATP eines apoptotischen Ereignisses verantwortlich sein[53].

Es ließ sich demonstrieren, dass Stimulation von Kardiomyozyten mit GDF-15 zu einer signifikanten und anhaltenden Phosphorylierung und damit Aktivierung sowohl der Proteinkinase AKT, als auch des BCL-Mitglieds Bad führte. Auch zeigte sich dass, die Phosphorylierung von Bad während der Ischämie-Periode bestand hatte. Phosphoryliertes Bad Protein konnte somit nicht an die mitochondriale Membran transloziert werden und dort die Überlebensfördernden Funktionen von BCL-2 und BCL-x hemmen. Somit kommt es zu einem geringeren Volumen an Cytochrom c Verlust und daher sowohl in der Ischämie, wie auch in der Ischämie-Reperfusion, zu einer geringeren Initiierung des mitochondrialen Zelltodes.

Um nun zu zeigen, dass auch die zytoprotektiven Effekte der GDF-15 Stimulation durch PI3Kinase-AKT-Bad abhängige Signaltransduktion gesteuert wird, wurden Kardiomyozyten mit PI3-Kinase-Inhibitoren vorstimuliert und anschließend mit GDF-15 kostimuliert. Es zeigte sich, dass sowohl die anti-nekrotischen Eigenschaften, als auch die anti-apoptotischen Effekte von GDF-15 durch eine Hemmung der PI3-Kinase reversibel waren. Diese vorliegenden Daten unterstützen die Hypothese, dass die GDF-15 mediierte Schutzwirkung auf Kardiomyozyten bei Ischämie und Ischämie Reperfusion durch eine PI3kinase abhängige Phosphorylierung von AKT und Bad vermittelt wird, die direkt den mitochondrialen Zelltod, der sowohl zu nekrotischem, wie auch apoptotischem Phänotyp führen kann, unterbindet.

Im Einklang mit diesen Ergebnissen hatte Uchiyama et al 2004 gezeigt, dass auch die zellprotektiven Effekte einer subletalen ischämischen Präkonditionierung nicht nur über eine Inhibierung der PI3-Kinase abgeschwächt werden, sondern auch zu einer Phosphorylierung von AKT und Bad führt, was in einer signifikant verminderten Caspasen-Aktivierung mit nachfolgender DNS Fragmentierung bei prolongierter Ischämie Reperfusion resultiert[74]. Es wäre demnach denkbar, dass auch hinter den

Daten von Uchiyama teilweise eine ischämie-reperfsions-getriggerte Induktion von GDF-15 in der Konditionierungsphase steht, die nachfolgend über eine Aktivierung der PI3-Kinase-AKT-Bad Achse die Kardiomyozyten vor Ischämie Reperfusion schützen kann.

Interessanterweise wird auch Stickstoffmonoxid und ebenso Peroxynitrit, beides potente GDF-15 Induktoren, in vielen Arbeiten mit dem Phänomen der ischämischen Präkonditionierung in Verbindung gebracht. Beide Substanzen scheinen direkt in die schützende Wirkung subletaler Ischämie-Dosen eingebunden zu sein. Auch hier könnte, zumindest im so genannten zweiten Fenster der Präkonditionierungsphase, die Induktion von GDF-15 durch NO oder Peroxynitrit teilweise die protektiven Effekte erklären[137, 138].

5.9 Aussicht: mögliche parakrine Effekte von GDF-15 in Myokardialen Gewebe

Nahe liegend für parakrine Effekte durch GDF-15 in der myokardialen Ischämie und Ischämie Reperfusion wäre die Inhibitorische Wirkung von GDF-15 auf die inflammatorische Tätigkeit infiltrierender Makrophagen, die durch ihre Gewebetrümmerabräumung und die damit verbundene Sezernierung pro-inflammatorischer Zytokine und Radikalproduktion, nicht unwesentlich zur Expansion des Gewebes Schadens beitragen[5]. Somit wäre auch in diesem Kontext eine gewebeerhaltende kardioprotektive Funktion von GDF-15 im Myokard denkbar[75].

Durch die prolongierte Induktion und Sezernierung, lässt sich jedoch auch vermuten, dass GDF-15 im Rahmen des myokardialen Heilungsprozess eine tragende Rolle spielt. Dieser auch als *Remodelling* bezeichnete Vorgang setzt sich aus verschiedensten Einzelkomponenten, wie kardiomyozytäre Hypertrophie, interstitielle Fibrose und Vernarbung durch Aktivierung sessiler Fibroblasten, sowie Gefäßproliferation und Angiogenese durch Proliferation und Migration endothelialer Zellen, aber auch durch Mobilisation, Homing, Proliferation und Differenzierung endothelialer Progenitoren, zusammen[5, 112-114].

Es stellte sich so unter anderem die Frage, ob GDF-15 Stimulationen auch in humanen Endothelzellen zu einer Aktivierung der PI3Kinase AKT-Achse führen. Diese Aktivierung ist vielfach beschrieben im Rahmen einer Endothelaktivierung, die

Diskussion

über eine Phosphorylierung der endothelialen NO-Synthase zu einer Erhöhten NO Bioverfügbarkeit im Gefäß führt, und so anti-thrombogen, gefäßdilatierend und anti-inflammatorisch wirkt. Auch in Endothelzellen führt die AKT Aktivierung über die PI3-Kinase zu anti-apoptotischen Wirkungen über die bekannten *AKT-downstream-targets*. Die endotheliale Apoptose spielt abgesehen von der Auslösung durch Stressoren auch in der Lösung aus dem endothelialen Verband eine Rolle. Sobald Endothelzellen sich aus ihrem Zellverband lösen und ihre Zell-Zell-Verbindungen getrennt werden, sterben sie einen apoptotischen Zelltod, ein physiologischer Vorgang der durch AKT Aktivierung unterdrückt werden kann. Auch die migratorische Beweglichkeit und die Proliferation der Endothelzellen, die für die Bildung neuer Gefäße im Gewebe unerlässlich ist, werden durch AKT-Aktivierung gefördert. So kommt es unter PI3-Kinase AKT Aktivierung zu einer Erhöhten Bildungsrate von Gefäßvorläuferstrukturen, so genannten *Tubes*.

Prototyp-Substanz der endothelialen Aktivierung über die PI3Kinase ist pro-angiogenetische, anti-apoptische Wachstumsfaktor VEGF. Dieser über Ischämie in einem *Hypoxia-Inducible Factor 1* (HIF-1) regulierten Prozess, induzierte Wachstumsfaktor stammt hauptsächlich aus den Endothelien selbst und spielt in der Revaskularisierung ischämischem Gewebes und auch der Tumorangiogenese eine bedeutende Rolle. Auch Hemmstoffe der HMG-CoA Reduktase, lipidsenkende Pharmaka, die auch als Statine bezeichnet werden, können im Endothel zu einer PI3-Kinase abhängigen AKT-Aktivierung führen, die auch über die Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit im Gefäßbett für Teile ihrer prognoseverbessernden Effekte verantwortlich gemacht wird[139].

Die gezeigte Phosphorylierung und damit Aktivierung der Proteinkinase AKT durch GDF-15 könnte einen weiteren Mechanismus beschreiben, wie die Revaskularisierung ischämischen Gewebes initiiert und reguliert wird. Kurzfristig könnte auch die Endothelaktivierung durch GDF-15, sofern auch sie die NO-Verfügbarkeit erhöht, zu anti-trombogenen, anti-inflammatorischen, sowie zur gefäßdilatativen Wirkungen führen und somit zur verbesserten Perfusion des Ischämieareals beitragen und den Gewebeschaden limitieren. Die anhaltende Induktion und Sezernierung von GDF-15 im Kardiomyozyten könnte als angiogenetischer Reiz fungieren und auch so den Post-Infarkt Heilungsprozess, durch Verbesserung der Gewebedurchblutung, positiv beeinflussen.

Diskussion

Diese Daten zeigen, dass der Untergang von myokardialen Gewebe im Akutgeschehen des Infarktes und der Ischämie Reperfusion, wie sie in der modernen klinischen Therapie angestrebt wird, wie auch in der prolongierten Phase des Remodelling, nicht linear abläuft, sondern ein an vielen Stellen komplex regulierter Prozess ist. In ischämischem Myokard produziertes und sezerniertes GDF-15 scheint in diesem Zusammenhang eine wichtige und funktionelle Rolle für die Adaption an kritische Konditionen und die Gewebekomäostase zu besitzen.

Zusammenfassung:

Die vorliegende Arbeit identifiziert das TGF- β Familienmitglied GDF-15 als ein Zytokin, das im Kardiomyozyten *in vitro* durch *nitrosativen Stress induziert werden kann*. Erstmals konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ebenfalls simulierte Ischämie Reperfusion *in vitro* zu einer gesteigerten GDF-15 Expression in Kardiomyozyten führt. Diese Induktion im Kardiomyozyten ist abhängig von redox-sensitiven Regelkreisen und der Formation von endogenem Stickstoff-Monoxid und Peroxynitrit. Kultivierte Kardiomyozyten sezernieren reifes GDF-15 in den Zellkulturüberstand. Eine Tatsache, die sowohl autokrine wie auch parakrine Effekte im myokardialen Zellverband denkbar macht.

Auch in einem gut etablierten *in vivo* Modell myokardialer Ischämie und Ischämie Reperfusion und in humanem Autopsiematerial von an myokardialer Ischämie verstorbenen Patienten, ließ sich zeigen, dass sowohl chronische Ischämie, wie auch Ischämie und anschließende Reperfusion zu einer signifikanten und anhaltenden GDF-15 Induktion im temporären oder dauerhaft ischämischen Areal führte.

Die vorliegenden, histologischen Daten lassen weiterhin vermuten, dass vor allem das minderdurchblutete, kompromittierte Myokard und die Kardiomyozyten im Infarkt- und Infarkttrandbereich ein maßgeblicher Ursprung für die gesteigerte GDF-15 Expression *in vivo* ist.

GDF-15 Knock-out Tiere entwickeln signifikant größere Infarkte, als Wildtyp-Mäuse. GDF-15 defiziente Mäuse entwickeln weiterhin eine größere Zahl apoptotischer Zellkerne im infarktangrenzenden Myokardareal. Damit konnte tierexperimentell bewiesen werden, dass endogenes GDF-15 als ein zellschützendes Agens fungiert, welches die Infarktgröße unter Ischämie Reperfusion limitiert.

Es ließ sich demonstrieren, dass Stimulation von kultivierten Kardiomyozyten mit GDF-15 zu einer signifikanten und anhaltenden Phosphorylierung und damit Aktivierung sowohl der Proteinkinase AKT, als auch des BCL-Mitglieds Bad führte. Diese Phosphorylierung, wie auch die protektiven Effekte *in vitro* waren reversibel durch eine Inhibierung der PI3Kinase-Akt-Signaltransduktionsachse.

GDF-15 ist somit ein Zytokin, das im Kardiomyozyten *in vitro*, *in vivo* und im Patienten durch Myokardischämie induziert und sezerniert wird und einen endogenen protektiven Faktor darstellt, der sowohl den apoptotischen, wie auch den nekrotischen Zelltod, über eine PI3Kinase-AKT abhängigen Signaltransduktionsweg, verhindern kann.

6. Quellennachweise

1. Sun, Y., et al., *Infarct scar as living tissue*. Basic Res Cardiol, 2002. **97**(5): p. 343-7.
2. Sun, Y. and K.T. Weber, *Infarct scar: a dynamic tissue*. Cardiovasc Res, 2000. **46**(2): p. 250-6.
3. Arbustini, E., et al., *From plaque biology to clinical setting*. Am Heart J, 1999. **138**(2 Pt 2): p. S55-60.
4. Buja, L.M. and M.L. Entman, *Modes of myocardial cell injury and cell death in ischemic heart disease*. Circulation, 1998. **98**(14): p. 1355-7.
5. Frangogiannis, N.G., C.W. Smith, and M.L. Entman, *The inflammatory response in myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(1): p. 31-47.
6. Jordan, J.E., Z.Q. Zhao, and J. Vinten-Johansen, *The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(4): p. 860-78.
7. Cleutjens, J.P., et al., *The infarcted myocardium: simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions*. Cardiovasc Res, 1999. **44**(2): p. 232-41.
8. Braunwald, E. and R.A. Kloner, *Myocardial reperfusion: a double-edged sword?* J Clin Invest, 1985. **76**(5): p. 1713-9.
9. Gottlieb, R.A., et al., *Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes*. J Clin Invest, 1994. **94**(4): p. 1621-8.
10. Fliss, H. and D. Gattinger, *Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium*. Circ Res, 1996. **79**(5): p. 949-56.
11. Kubasiak, L.A., et al., *Hypoxia and acidosis activate cardiac myocyte death through the Bcl-2 family protein BNIP3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 12825-30.
12. Green, D.R. and J.C. Reed, *Mitochondria and apoptosis*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1309-12.
13. Kroemer, G. and J.C. Reed, *Mitochondrial control of cell death*. Nat Med, 2000. **6**(5): p. 513-9.
14. Borutaite, V. and G.C. Brown, *Mitochondria in apoptosis of ischemic heart*. FEBS Lett, 2003. **541**(1-3): p. 1-5.
15. Kim, J.S., L. He, and J.J. Lemasters, *Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **304**(3): p. 463-70.
16. Piper, H.M., K. Meuter, and C. Schafer, *Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury*. Ann Thorac Surg, 2003. **75**(2): p. S644-8.
17. Newmeyer, D.D. and S. Ferguson-Miller, *Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death*. Cell, 2003. **112**(4): p. 481-90.
18. Saikumar, P., et al., *Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury*. Oncogene, 1998. **17**(25): p. 3341-9.
19. Piper, H.M., D. Garcia-Dorado, and M. Ovize, *A fresh look at reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 1998. **38**(2): p. 291-300.
20. Demarex, N. and C. Distelhorst, *Cell biology. Apoptosis--the calcium connection*. Science, 2003. **300**(5616): p. 65-7.
21. Cadenas, E., et al., *Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria*. Arch Biochem Biophys, 1977. **180**(2): p. 248-57.
22. Boveris, A., E. Cadenas, and A.O. Stoppani, *Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide*. Biochem J, 1976. **156**(2): p. 435-44.

23. Thompson, C.B., *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1456-62.
24. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
25. Thornberry, N.A., *Caspases: key mediators of apoptosis*. Chem Biol, 1998. **5**(5): p. R97-103.
26. Thornberry, N.A. and Y. Lazebnik, *Caspases: enemies within*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1312-6.
27. Soldani, C. and A.I. Scovassi, *Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update*. Apoptosis, 2002. **7**(4): p. 321-8.
28. Watanabe, H., et al., *Apoptosis of a fibrosarcoma induced by protein-free culture involves DNA cleavage to large fragments but not internucleosomal fragmentation*. Int J Cancer, 1995. **62**(2): p. 191-8.
29. Oberhammer, F., et al., *Apoptosis is induced by transforming growth factor-beta 1 within 5 hours in regressing liver without significant fragmentation of the DNA*. Hepatology, 1993. **18**(5): p. 1238-46.
30. Ravichandran, K.S., *"Recruitment signals" from apoptotic cells: invitation to a quiet meal*. Cell, 2003. **113**(7): p. 817-20.
31. Kim, J.S., T. Qian, and J.J. Lemasters, *Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes*. Gastroenterology, 2003. **124**(2): p. 494-503.
32. Kuwana, T. and D.D. Newmeyer, *Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(6): p. 691-9.
33. Martinou, J.C. and D.R. Green, *Breaking the mitochondrial barrier*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(1): p. 63-7.
34. Zhao, Z.Q. and J. Vinten-Johansen, *Myocardial apoptosis and ischemic preconditioning*. Cardiovasc Res, 2002. **55**(3): p. 438-55.
35. Li, P., et al., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell, 1997. **91**(4): p. 479-89.
36. Kluck, R.M., et al., *The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis*. Science, 1997. **275**(5303): p. 1132-6.
37. Zha, J., et al., *Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)*. Cell, 1996. **87**(4): p. 619-28.
38. Vander Heiden, M.G. and C.B. Thompson, *Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis?* Nat Cell Biol, 1999. **1**(8): p. E209-16.
39. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. Cell, 1997. **91**(2): p. 231-41.
40. Rosse, T., et al., *Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c*. Nature, 1998. **391**(6666): p. 496-9.
41. Jurgensmeier, J.M., et al., *Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(9): p. 4997-5002.
42. Asumendi, A., et al., *Implication of mitochondria-derived ROS and cardiolipin peroxidation in N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis*. Br J Cancer, 2002. **86**(12): p. 1951-6.
43. Korsmeyer, S.J., et al., *Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c*. Cell Death Differ, 2000. **7**(12): p. 1166-73.
44. Crompton, M., A. Costi, and L. Hayat, *Evidence for the presence of a reversible Ca²⁺-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria*. Biochem J, 1987. **245**(3): p. 915-8.

45. Halestrap, A.P., S.J. Clarke, and S.A. Javadov, *Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 372-85.
46. Weiss, J.N., et al., *Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease*. Circ Res, 2003. **93**(4): p. 292-301.
47. Zamzami, N. and G. Kroemer, *The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(1): p. 67-71.
48. Eskes, R., et al., *Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions*. J Cell Biol, 1998. **143**(1): p. 217-24.
49. Zamzami, N., et al., *Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death*. J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 367-77.
50. Liu, X., et al., *Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c*. Cell, 1996. **86**(1): p. 147-57.
51. Waterhouse, N.J., et al., *Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process*. J Cell Biol, 2001. **153**(2): p. 319-28.
52. Heiskanen, K.M., et al., *Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome c release during apoptosis in PC6 cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(9): p. 5654-8.
53. Nicotera, P., M. Leist, and E. Ferrando-May, *Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis*. Toxicol Lett, 1998. **102-103**: p. 139-42.
54. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 448-60.
55. Williams, R.S. and I.J. Benjamin, *Protective responses in the ischemic myocardium*. J Clin Invest, 2000. **106**(7): p. 813-8.
56. Piper, H.M. and D. Garcia-Dorado, *Prime causes of rapid cardiomyocyte death during reperfusion*. Ann Thorac Surg, 1999. **68**(5): p. 1913-9.
57. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. **74**(5): p. 1124-36.
58. Garcia-Dorado, D., J. Vinten-Johansen, and H.M. Piper, *Bringing preconditioning and postconditioning into focus*. Cardiovasc Res, 2006. **70**(2): p. 167-9.
59. Garcia-Dorado, D. and H.M. Piper, *Postconditioning: reperfusion of "reperfusion injury" after hibernation*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(1): p. 1-3.
60. Murphy, E., *Primary and secondary signaling pathways in early preconditioning that converge on the mitochondria to produce cardioprotection*. Circ Res, 2004. **94**(1): p. 7-16.
61. Nelson, S.K., G.H. Wong, and J.M. McCord, *Leukemia inhibitory factor and tumor necrosis factor induce manganese superoxide dismutase and protect rabbit hearts from reperfusion injury*. J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(1): p. 223-9.
62. Zhou, M., et al., *A novel splice variant of the cell death-promoting protein BAX*. J Biol Chem, 1998. **273**(19): p. 11930-6.
63. Brar, B.K., et al., *Cardiotrophin-1 can protect cardiac myocytes from injury when added both prior to simulated ischaemia and at reoxygenation*. Cardiovasc Res, 2001. **51**(2): p. 265-74.
64. Mehrhof, F.B., et al., *In cardiomyocyte hypoxia, insulin-like growth factor-I-induced antiapoptotic signaling requires phosphatidylinositol-3-OH-kinase-dependent and mitogen-activated protein kinase-dependent activation of the transcription factor cAMP response element-binding protein*. Circulation, 2001. **104**(17): p. 2088-94.

65. Parsa, C.J., et al., *A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart*. J Clin Invest, 2003. **112**(7): p. 999-1007.
66. Okumura, H., et al., *Adrenomedullin infusion attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway*. Circulation, 2004. **109**(2): p. 242-8.
67. Lefer, A.M., et al., *Mediation of cardioprotection by transforming growth factor-beta*. Science, 1990. **249**(4964): p. 61-4.
68. Lefer, A.M., et al., *Mechanism of the cardioprotective effect of transforming growth factor beta 1 in feline myocardial ischemia and reperfusion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(3): p. 1018-22.
69. Datta, S.R., A. Brunet, and M.E. Greenberg, *Cellular survival: a play in three Akts*. Genes Dev, 1999. **13**(22): p. 2905-27.
70. Kennedy, S.G., et al., *Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(8): p. 5800-10.
71. Vivanco, I. and C.L. Sawyers, *The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(7): p. 489-501.
72. Scheid, M.P. and J.R. Woodgett, *PKB/AKT: functional insights from genetic models*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(10): p. 760-8.
73. Shiojima, I. and K. Walsh, *Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis*. Circ Res, 2002. **90**(12): p. 1243-50.
74. Uchiyama, T., et al., *Role of Akt signaling in mitochondrial survival pathway triggered by hypoxic preconditioning*. Circulation, 2004. **109**(24): p. 3042-9.
75. Bootcov, M.R., et al., *MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(21): p. 11514-9.
76. Brown, D.A., et al., *Concentration in plasma of macrophage inhibitory cytokine-1 and risk of cardiovascular events in women: a nested case-control study*. Lancet, 2002. **359**(9324): p. 2159-63.
77. Fairlie, W.D., et al., *MIC-1 is a novel TGF-beta superfamily cytokine associated with macrophage activation*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(1): p. 2-5.
78. Strelau, J., et al., *GDF-15/MIC-1 a novel member of the TGF-beta superfamily*. J Neural Transm Suppl, 2000(60): p. 273-6.
79. Baek, S.J., et al., *Expression of NAG-1, a transforming growth factor-beta superfamily member, by troglitazone requires the early growth response gene EGR-1*. J Biol Chem, 2004. **279**(8): p. 6883-92.
80. Baek, S.J., et al., *Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-beta superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities*. Mol Pharmacol, 2001. **59**(4): p. 901-8.
81. Baek, S.J., J.M. Horowitz, and T.E. Eling, *Molecular cloning and characterization of human nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene promoter. Basal transcription is mediated by Sp1 and Sp3*. J Biol Chem, 2001. **276**(36): p. 33384-92.
82. Bottner, M., et al., *Characterization of the rat, mouse, and human genes of growth/differentiation factor-15/macrophage inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1)*. Gene, 1999. **237**(1): p. 105-11.
83. Bottner, M., et al., *Expression of a novel member of the TGF-beta superfamily, growth/differentiation factor-15/macrophage-inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in adult rat tissues*. Cell Tissue Res, 1999. **297**(1): p. 103-10.
84. Lawton, L.N., et al., *Identification of a novel member of the TGF-beta superfamily highly expressed in human placenta*. Gene, 1997. **203**(1): p. 17-26.
85. Yan, S.F., et al., *Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress*. Nat Med, 2000. **6**(12): p. 1355-61.

86. Sasaki, H., N. Galang, and N. Maulik, *Redox regulation of NF-kappaB and AP-1 in ischemic reperfused heart*. Antioxid Redox Signal, 1999. **1**(3): p. 317-24.
87. Lyn, D., et al., *Gene expression profile in mouse myocardium after ischemia*. Physiol Genomics, 2000. **2**(3): p. 93-100.
88. Hsiao, E.C., et al., *Characterization of growth-differentiation factor 15, a transforming growth factor beta superfamily member induced following liver injury*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(10): p. 3742-51.
89. Li, P.X., et al., *Placental transforming growth factor-beta is a downstream mediator of the growth arrest and apoptotic response of tumor cells to DNA damage and p53 overexpression*. J Biol Chem, 2000. **275**(26): p. 20127-35.
90. Tan, M., et al., *PTGF-beta, a type beta transforming growth factor (TGF-beta) superfamily member, is a p53 target gene that inhibits tumor cell growth via TGF-beta signaling pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(1): p. 109-14.
91. Strelau, J., et al., *Growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 is a novel trophic factor for midbrain dopaminergic neurons in vivo*. J Neurosci, 2000. **20**(23): p. 8597-603.
92. Albertoni, M., et al., *Anoxia induces macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in glioblastoma cells independently of p53 and HIF-1*. Oncogene, 2002. **21**(27): p. 4212-9.
93. Tong, S., et al., *Serum concentrations of macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC 1) as a predictor of miscarriage*. Lancet, 2004. **363**(9403): p. 129-30.
94. Iwaki, K., et al., *Alpha- and beta-adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. fos/jun expression is associated with sarcomere assembly; Egr-1 induction is primarily an alpha 1-mediated response*. J Biol Chem, 1990. **265**(23): p. 13809-17.
95. Esumi, K., et al., *NADH measurements in adult rat myocytes during simulated ischemia*. Am J Physiol, 1991. **260**(6 Pt 2): p. H1743-52.
96. Brar, B.K., et al., *Urocortin protects against ischemic and reperfusion injury via a MAPK-dependent pathway*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8508-14.
97. Stephanou, A., et al., *Ischemia-induced STAT-1 expression and activation play a critical role in cardiomyocyte apoptosis*. J Biol Chem, 2000. **275**(14): p. 10002-8.
98. Fujio, Y., et al., *Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart*. Circulation, 2000. **101**(6): p. 660-7.
99. Gavrieli, Y., Y. Sherman, and S.A. Ben-Sasson, *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. J Cell Biol, 1992. **119**(3): p. 493-501.
100. Simpson, D.A., et al., *Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR*. Mol Vis, 2000. **6**: p. 178-83.
101. Bustin, S.A., *Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems*. J Mol Endocrinol, 2002. **29**(1): p. 23-39.
102. Ginzinger, D.G., *Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream*. Exp Hematol, 2002. **30**(6): p. 503-12.
103. Thellin, O., et al., *Housekeeping genes as internal standards: use and limits*. J Biotechnol, 1999. **75**(2-3): p. 291-5.
104. Wollert, K.C., et al., *Gene transfer of cGMP-dependent protein kinase I enhances the antihypertrophic effects of nitric oxide in cardiomyocytes*. Hypertension, 2002. **39**(1): p. 87-92.
105. Wang, P. and J.L. Zweier, *Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury*. J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 29223-30.

106. Pfeilschifter, J., W. Eberhardt, and A. Huwiler, *Nitric oxide and mechanisms of redox signaling*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(8 Suppl 3): p. S237-40.
107. Pilz, R.B. and D.E. Casteel, *Regulation of gene expression by cyclic GMP*. Circ Res, 2003. **93**(11): p. 1034-46.
108. Lalu, M.M., W. Wang, and R. Schulz, *Peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury*. Heart Fail Rev, 2002. **7**(4): p. 359-69.
109. Balligand, J.L., et al., *Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro*. J Biol Chem, 1994. **269**(44): p. 27580-8.
110. Arstall, M.A., et al., *Cytokine-mediated apoptosis in cardiac myocytes: the role of inducible nitric oxide synthase induction and peroxynitrite generation*. Circ Res, 1999. **85**(9): p. 829-40.
111. Nijmeijer, R., et al., *C-reactive protein activates complement in infarcted human myocardium*. Am J Pathol, 2003. **163**(1): p. 269-75.
112. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 601-5.
113. Dimmeler, S. and A.M. Zeiher, *Akt takes center stage in angiogenesis signaling*. Circ Res, 2000. **86**(1): p. 4-5.
114. Dimmeler, S., et al., *Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells: involvement in suppression of apoptosis*. Circ Res, 1998. **83**(3): p. 334-41.
115. Ambrosio, G. and I. Tritto, *Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications*. Am Heart J, 1999. **138**(2 Pt 2): p. S69-75.
116. Gill, C., R. Mestrlil, and A. Samali, *Losing heart: the role of apoptosis in heart disease--a novel therapeutic target?* Faseb J, 2002. **16**(2): p. 135-46.
117. Ross, A.M., et al., *A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II)*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(11): p. 1775-80.
118. Roberts, A.B., et al., *New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(9): p. 5339-43.
119. Roberts, A.B., et al., *Role of transforming growth factor-beta in maintenance of function of cultured neonatal cardiac myocytes. Autocrine action and reversal of damaging effects of interleukin-1*. J Clin Invest, 1992. **90**(5): p. 2056-62.
120. Derynck, R., et al., *Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells*. Nature, 1985. **316**(6030): p. 701-5.
121. Chen, H., et al., *TGF-beta 1 attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via inhibition of upregulation of MMP-1*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(5): p. H1612-7.
122. Matsumoto-Ida, M., et al., *Activation of TGF-beta1-TAK1-p38 MAPK pathway in spared cardiomyocytes is involved in left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(2): p. H709-15.
123. Bauskin, A.R., et al., *Role of macrophage inhibitory cytokine-1 in tumorigenesis and diagnosis of cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(10): p. 4983-6.
124. Das, D.K., *Redox regulation of cardiomyocyte survival and death*. Antioxid Redox Signal, 2001. **3**(1): p. 23-37.
125. Subramaniam, S., J. Strelau, and K. Unsicker, *Growth differentiation factor-15 prevents low potassium-induced cell death of cerebellar granule neurons by*

- differential regulation of Akt and ERK pathways*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 8904-12.
126. Paralkar, V.M., et al., *Cloning and characterization of a novel member of the transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein family*. J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13760-7.
127. Durbec, P., et al., *GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase*. Nature, 1996. **381**(6585): p. 789-93.
128. Piper, H.M., Y. Abdallah, and C. Schafer, *The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 365-71.
129. Lochner, A., et al., *Nitric oxide triggers classic ischemic preconditioning*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **962**: p. 402-14.
130. Moncada, S. and J.D. Erusalimsky, *Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(3): p. 214-20.
131. Moncada, S. and A. Higgs, *The L-arginine-nitric oxide pathway*. N Engl J Med, 1993. **329**(27): p. 2002-12.
132. Mungue, I.N., et al., *Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death*. J Clin Invest, 2002. **109**(6): p. 735-43.
133. Wollert, K.C., et al., *Prognostic value of growth-differentiation factor-15 in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome*. Circulation, 2007. **115**(8): p. 962-71.
134. Bauskin, A.R., et al., *The propeptide of macrophage inhibitory cytokine (MIC-1), a TGF-beta superfamily member, acts as a quality control determinant for correctly folded MIC-1*. Embo J, 2000. **19**(10): p. 2212-20.
135. Matsui, T., et al., *Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo*. Circulation, 2001. **104**(3): p. 330-5.
136. Mockridge, J.W., M.S. Marber, and R.J. Heads, *Activation of Akt during simulated ischemia/reperfusion in cardiac myocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **270**(3): p. 947-52.
137. Bolli, R., et al., *The protective effect of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is mediated by nitric oxide synthase. Evidence that nitric oxide acts both as a trigger and as a mediator of the late phase of ischemic preconditioning*. Circ Res, 1997. **81**(6): p. 1094-107.
138. Ferdinandy, P. and R. Schulz, *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning*. Br J Pharmacol, 2003. **138**(4): p. 532-43.
139. Bell, R.M. and D.M. Yellon, *Atorvastatin, administered at the onset of reperfusion, and independent of lipid lowering, protects the myocardium by up-regulating a pro-survival pathway*. J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(3): p. 508-15.

Lebenslauf:

Persönliche Daten:

Matthias Eden
Geboren am 01.09.1978 in Esens,
ledig, keine Kinder

Schul- und Hochschulbildung:

1984-1988	Grundschule Burhafa
1988-07/1998	Orientierungsstufe und Gymnasialzweig der KGS Alexander-von-Humboldt-Schule Wittmund, Leistungskurse Biologie und Chemie (<i>Note 1,4</i> ; Bester Schüler des Jahrgangs)
07/1998-09/1999	Ferienarbeit im VW-Werk Emden
09/1998-07/1999	Grundwehrdienst im JG 71 „Richthofen“ und im Bundeswehrkrankenhaus Bad-Zwischenahn
10/1999-05/2006	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Hochschule Hannover
09/2001	Ärztliche Vorprüfung (<i>Note 2</i>)
09/2002	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (<i>Note 2</i>)
04/2005	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (<i>Note 1,66</i>)
04/2006	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung <i>Gesamt-Note 1</i>)
05/2005-04/2006	Praktisches Jahr (Anästhesie: Med. Hochschule Hannover, Innere Medizin: Klinikum Hildesheim, Chirurgie: Henriettenstiftung Hannover).
10/2002-11/2004	Experimentelle Dissertation in der molekularen Kardiologie in der AG von PD Dr. med. KC Wollert; Vorläufiger Titel <i>„GDF-15, ein neues Zytokin der TGF-β Familie, wird im ischämischen Herzen induziert und schützt es vor Schäden durch Ischämie und Ischämie- Reperfusion“</i>

Publikationen:

Zweit-Autor: "The Transforming Growth Factor- β Superfamily Member Growth-Differentiation Factor-15 Protects the Heart From Ischemia/Reperfusion Injury" (*Circ Res.* 2006; 98:351-360.).

T. Kempf, M. Eden, H.W. Niessen, Chr. Willenbockel, M.. Naguib, J. Tongers, D. Kotlarz, Chr. Templin, J. Strelau, K.C.Wollert (Hannover & Heidelberg; Amsterdam, NL) Growth Differentiation Factor-15 wird im infarzierten humanen Myokard induziert und wirkt kardioprotektiv bei Ischämie/Reperfusion in vitro und in vivo. 71. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kardiologie. Vortrag V534

Beruflicher Werdegang:

Assistenzarzt in der
Kardiologie, Angiologie und Pneumologie in der Ludolf-
Krehl-Klinik im Universitätsklinikum Heidelberg

.....
Heidelberg, den

.....
Unterschrift

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte
Dissertation mit dem Titel „Growth Differentiation Faktor 15
Ein neuartiges Zytokin der TGF-beta Familie schützt Kardiomyozyten vor ischämie-
reperusions-assoziiertem Zellschaden in vitro und in vivo“
in der Kardiologie und Angiologie unter Betreuung von Prof. Dr. med. K.C. Wollert mit der
Unterstützung durch Dr. med. Tibor Kempf, ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Ab-
fassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.
Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion
eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht
erworben habe.
Ergebnisse der Dissertation wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht "*The
Transforming Growth Factor- β Superfamily Member Growth-Differentiation Factor-15
Protects the Heart From Ischemia/Reperfusion Injury*" (*Circ Res.* 2006; 98:351-360.).

Heidelberg, den

.....
(Unterschrift)