

# **Charakterisierung von Apoptose als Effektormechanismus der akuten Abstoßung und ihre intrazellulären Signaltransduktionswege**

(VI 63-19c20-15 (1) GI 20/10-Nr. 38/2002)

## **Inauguraldissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von:

**Marion Kreis, geb. Ensslen**  
aus Bad Nauheim

Gießen 2007

Aus der  
Medizinischen Klinik I (Kardiologie / Angiologie)  
am Zentrum für Innere Medizin  
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen  
(Dir.: Universitäts-Professor Dr. med. Harald Tillmanns)

Gutachter: Prof. Dr. H. Hölschermann

Gutachter: Prof. Dr. G. Euler

Tag der Disputation: 8.11.2007

Für meine Familie

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1	Transplantatabstoßung	7
1.1.1	Hintergrund der Transplantatabstoßung	7
1.1.2	Einteilung der Transplantatabstoßung	8
1.1.3	Akute Abstoßung	9
1.2	Nekrose oder Apoptose	11
1.2.1	Allgemeine Unterschiede zwischen Nekrose und Apoptose	11
1.2.2	Morphologische Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose	13
1.3	Apoptoseregulation	17
1.3.1	Möglichkeiten der intrazellulären Apoptoseregulation	17
1.3.2	Caspase 3	22
1.3.3	Bax und Bcl-2	22
1.3.4	FasL	23
1.3.5	Akt	25
1.3.6	NFκB und IκB	26
1.3.7	iNOS	27
1.4	Fragestellung	28
<b>2</b>	<b>Material und Methode</b>	<b>29</b>
2.1	Tiermodell	29
2.1.1	Herkunft und Betreuung der Tiere	30
2.1.2	Versuchsgenehmigung	30
2.1.3	Heterotopes, allogenes Transplantationsmodell	31
2.1.3.1	Vorbereitung	31
2.1.3.2	Operationsprotokoll der Herztransplantation	31
2.1.3.3	Überwachung der Transplantatfunktion	32
2.1.3.4	Operationsprotokoll der Gewebeentnahme	33
2.2	Histologie/ Immunhistochemie	34
2.2.1	Gewebefärbung mit Elastika-Hämatoxylin-Eosin	34
2.2.2	Immunhistochemische Färbung von iNOS	35
2.3	Apoptosenachweis	38

2.3.1	DNA-Laddering	38
2.3.2	<i>Terminale-Deoxynucleotidyl-Transferase-mediated dUTP Nick-End-Labeling (TUNEL-Assay)</i>	39
2.3.3	TUNEL-Assay und Gegenfärbung	40
2.3.4	Auswertung TUNEL-Assay und Gegenfärbung	40
2.4	Protein-Analyse mittels SDS-Page und Western Blot	41
2.4.1	Proteinisolierung und Bestimmung der Proteinkonzentration	41
2.4.2	SDS-Page	42
2.4.3	Western Blot	45
2.4.4	Immunfärbung der Blot-Membran	46
2.4.5	„Strippen“ von Blotmembranen und Immunfärbung mit Aktin	47
2.4.6	Auswertung	49
2.5	Semiquantitative RT-PCR	49
2.5.1	RNA-Isolierung	49
2.5.2	Reverse Transkription	50
2.5.3	PCR	51
2.5.4	Gel-Elektrophorese	52
2.5.5	mRNA-Auswertung	53
2.6	Statistische Auswertung	53
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>55</b>
3.1	Transplantatabstoßung	55
3.1.1	Kinetik der Transplantatabstoßung	55
3.1.2	Histologischer Nachweis der Transplantatabstoßung	56
3.2	Apoptosenachweis	58
3.2.1	DNA-Laddering	58
3.2.2	TUNEL-Assay und Gegenfärbung	59
3.3	Apoptoseregulation	62
3.3.1	iNOS	63
3.3.2	Bax und Bcl-2	65
3.3.3	Posttranskriptionelle Degradation von Bcl-2	67
3.3.4	FasL	68
3.3.5	Caspase 3	69

3.3.6	Akt	71
3.3.7	NFκB und IκB	72
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>74</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>92</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>94</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>96</b>
<b>8</b>	<b>Verzeichnisse</b>	<b>108</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis	108
8.2	Abbildungsverzeichnis	111
8.3	Tabellenverzeichnis	112
<b>9</b>	<b>Wissenschaftliche Beiträge</b>	<b>113</b>
<b>10</b>	<b>Danksagungen</b>	<b>114</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>115</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Transplantatabstoßung

#### 1.1.1 Hintergrund der Transplantatabstoßung

Organtransplantation stellt eine wichtige Therapiemöglichkeit bei Versagen von z. B. Leber, Herz, Niere und Lunge dar. Seit Bestehen registrierte die internationale Gesellschaft für Herz- und Lungentransplantation bis Juli 2006 über 78.000 Herztransplantationen [1]. Durch Einbeziehung immunologischer Kenntnisse, Verbesserungen der chirurgischen Behandlung, der immunsuppressiven und anti-infektiösen Therapie konnten die Überlebensraten nach Herztransplantation seit Beginn der Organtransplantation (erste syngene Transplantation 1954 [2], erste allogene Herztransplantation 1967 [3]) inzwischen deutlich verbessert werden. Todesursachen nach Transplantation sind weiterhin das primäre und unspezifische Transplantatversagen, nicht-CMV-spezifische Infektionen, akute Abstoßung, die Entwicklung von Malignomen und das späte Organversagen durch die Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie [1].

Verantwortlich für die Transplantatabstoßung ist eine Immunreaktion des Empfängers auf Alloantigene, d. h. Antigene, die sich bei verschiedenen Individuen derselben Spezies unterscheiden. Durch die Fremdproteine werden Immunzellen aktiviert, Makrophagen, Natürliche-Killerzellen und T-Zellen infiltrieren das transplantierte Organ [4]. Es kommt zur massiven Ansammlung von Zellen in Transplantaten und in der Folge dieser starken Zellreaktion zu entzündlichen Prozessen, zur Veränderung der Organstruktur, zur Gewebeschädigung bis hin zum kompletten Funktionsverlust. Die frühzeitige Erkennung und Behandlung einer Abstoßung nach Herztransplantation wurde ermöglicht durch die 1973 in Stanford eingeführte Endomyokardbiopsie (EMB)

## Einleitung

[5]. Sie gilt bis heute als Goldstandard der Abstoßungsdiagnostik nach Herztransplantation (s. *review* [6]).

Durch Gabe von Immunsuppressiva wird die Immunreaktion des Empfängers auf diese Transplantatantigene unterdrückt. Die gesamte Immunabwehr wird jedoch geschwächt, so dass eine Gefahr für opportunistische Infektionen besteht (virale Infektionen, z. B. CMV, atypische bakterielle Infektionen, z. B. *Pneumocystis carinii*, atypische Mykobakterien, Pilze), bis hin zur Sepsis [7-10]. Der Erfolg der Transplantation bleibt davon abhängig, ob Transplantatabstoßung unterdrückt und eine Infektion vermieden werden kann.

### 1.1.2 Einteilung der Transplantatabstoßung

Transplantatabstoßung wird formal eingeteilt in akute und chronische Abstoßung. Die Übergänge der einzelnen Abstoßungsvorgänge sind jedoch fließend, und es besteht eine Vielzahl von Mischformen.

Beim akuten Verlauf handelt es sich um eine zell-vermittelte Abstoßungsreaktion nach Ersttransplantation ohne vorhergehende Sensibilisierung des Empfängers. Ohne Immunsuppression (unmodifizierte Form) erfolgt akute Abstoßung innerhalb von 7 Tagen [11]. Auch unter Immunsuppression kann es noch zu Episoden von akuter Abstoßung im ersten Jahr nach Transplantation kommen.

Die chronische Abstoßung erfolgt allmählich unter Gabe von Immunsuppressiva (modifiziert) und tritt nach Monaten bis Jahren auf. Charakterisiert ist das Organ dabei durch geringe entzündliche Veränderungen im Parenchym, die zu einem fibrotischen Umbau führen [12], und durch starke Intimaproliferation, Gefäßverengung und Vasookklusion, auch genannt Transplantatvaskulopathie. Humorale Antikörper und Immunzellen sind an der Bildung der Transplantatvaskulopathie beteiligt [13-15]. Über endotheliale Adhäsionsmoleküle wandern T-Lymphozyten, Makrophagen und Neutrophile in den subendothelialen Raum und lösen einen Entzündungsprozess aus. Zytokine und



## Einleitung

Wachstumsfaktoren sorgen dann für die Progression dieses Prozesses [15, 16]. Das Erscheinungsbild der Gefäßveränderungen variiert mit der Zeit nach Transplantation und der Schwere der Gefäßerkrankung: von Vaskulitis, Intimafibrose bis hin zu arteriosklerotischen Plaques (s. *review* [15, 16]). Klinisch äußert sich der Gefäßverschluss auf Grund des denervierten Herzens selten durch Angina pectoris, meist durch akutes Pumpversagen, und plötzlichen Herztod [17].

Zusätzlich zu diesen beiden Formen kann man noch eine akzelerierte Abstoßung unterscheiden. Eine vorhergehende Sensibilisierung des Empfängers auf Alloantigene sorgt für eine rasche Abstoßung der Transplantate in Form der akzelerierten Abstoßung innerhalb von Stunden bis wenigen Tagen. Es werden Antikörper dafür verantwortlich gemacht, welche bei vorhergehenden Transplantationen, Bluttransfusionen, Schwangerschaften oder bei klinisch wiederholten Phasen der Transplantatabstoßung gebildet wurden. T- und B-Zellen vermitteln die Immunreaktion dieser Abstoßungsform. Morphologisch zeichnen sich die abgestoßenen Herzen durch ein Ödem, eine Myozytendegeneration und -nekrose, durch interstitielle Hämorrhagien und Mikrothromben aus [18].

### 1.1.3 Akute Abstoßung

Akute Abstoßung ist eine wesentliche Ursache der Mortalität, Morbidität und des Transplantatverlustes im ersten postoperativen Jahr. Sie ist verantwortlich für 20 % aller Todesfälle nach Herztransplantation [19-21]. Im Mittel erleidet jeder Herztransplantierte im ersten Jahr nach Transplantation unter Immunsuppression  $1,3 \pm 0,7$  Abstoßungsepisoden [22]. Die Mehrheit der Abstoßungsepisoden sind asymptomatisch (hämodynamisch nicht relevant) und treten innerhalb der ersten 6 Monate nach Transplantation auf [20].

Die hämodynamisch relevante akute Abstoßung zeigt sich klinisch durch eine Hypotension, Dyspnoe, periphere Ödeme und durch weitere Zeichen einer Herzinsuffizienz. Echokardiographisch ist die akute Abstoßung kombiniert mit

## Einleitung

einer linksventrikulären Hypertrophie und einer diastolischen Funktionsstörung [6].

Die nicht hämodynamisch relevante Form kann nur durch regelmäßige Kontrollbiopsien festgestellt werden. Diese Endomyokardbiopsien sind wichtig, da auch eine klinisch inapparente akute Abstoßung zu einer chronischen Abstoßung disponiert [23, 24] und in diesem Fall die Indikation einer intensivierten Immunsuppression gegeben ist.

Ein histologisches Charakteristikum der akuten Abstoßung ist die progressive Infiltration des Transplantatgewebes durch mononukleäre Zellen [25]. Das Organ wird mit Makrophagen und Lymphozyten durchwandert und stark entzündlich, ödematös verändert. Man findet diffuse Gewebeschäden und fokale Nekrosen [12]. Vaskuläre Veränderungen wie arterielle Thrombosen, interstitielle Hämorrhagien und fibrinoide Gefäßwandnekrosen treten auf [4]. Die Klassifikation der akuten Abstoßung erfolgt nach den Kriterien der Internationalen Gesellschaft für Herz- und Lungentransplantation (ISHLT-Klassifikation, International Society for Heart and Lung Transplantation) [26, 27].

Die Immunreaktion der akuten Abstoßung ist vor allem T-Zell-vermittelt. Die Empfänger-T-Lymphozyten erkennen die fremden Transplantatantigene, werden zur Proliferation und Differenzierung angeregt und produzieren eine Reihe von Zytokinen [28]. Diese Zytokine helfen zytotoxischen T-Zellen, Makrophagen und Natürlichen Killerzellen, eine Zytotoxizität gegen das Transplantat zu entwickeln [28]. Zusätzlich kann die Produktion von Anti-Spender-Antikörpern über die Antikörper abhängige zelluläre Zytotoxizität oder eine Komplementaktivierung zur Transplantatzerstörung führen [29]. Zytokine und Zytotoxine führen bei der Zielzelle dann über verschiedene Mechanismen zum Zelltod.

### 1.2 Nekrose oder Apoptose

#### 1.2.1 Allgemeine Unterschiede zwischen Nekrose und Apoptose

Während der akuten Abstoßung nach Organtransplantation kann der Tod einer Zelle durch Apoptose und Nekrose erfolgen [30-33]. Die Unterscheidung von Apoptose und Nekrose wird anhand morphologischer und biochemischer Parameter getroffen [34-36].

Nekrose ist ein nicht oder nur gering regulierter Mechanismus [37] und durch irreversible Veränderungen im Nukleus und Zytoplasma gekennzeichnet [38]. Es ist ein passiver, pathologischer Prozess, der ohne Energieverbrauch abläuft, mit einer starken Entzündung einhergeht (Inflammation) [37] und zu einer Fibrose führt [39].

Ein energieverbrauchender Prozess, bei dem eine Zelle zugrunde geht, ohne das umgebende Gewebe mit einzubeziehen (keine Inflammation), wird Apoptose genannt [40]. Er ist relevant bei physiologischen als auch pathologischen Gewebeveränderungen und seine Regulierung erfolgt durch Proteasen und Nukleasen [37]. Apoptose gilt als eine Form des programmierten Zelltodes, der sich dadurch auszeichnet, dass die Zelle, genetisch programmiert, zu einer vorbestimmten Zeit stirbt [38]. Im Gegensatz zu Nekrose ist Apoptose reversibel, verläuft in Stufen, und ist deshalb möglicherweise beeinfluss- oder umkehrbar [40]. Dieses bietet einen Ansatz für neue Therapien in der Transplantationsmedizin.

**Tabelle 1: Apoptose versus Nekrose**

modifiziert nach [37], charakteristische Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose

<b>Zelltod:</b>	<b>Apoptose</b>	<b>Nekrose</b>
<b>Auftreten im Organismus:</b>	Physiologisch oder pathologisch	Pathologisch
<b>Regulation:</b>	Exakte Regulation	Kaum oder keine Regulation
<b>Zellmembran:</b>	Nahezu intakte Zellmembran bis zur Phagozytose	Die Plasmamembran wird früh beschädigt
<b>Freisetzung von Zellinhalt:</b>	Keine Freisetzung von Zellbestandteilen	Freisetzung von Zellbestandteilen
<b>Entzündung:</b>	geringe oder keine Entzündung	Entzündung
<b>Energieverbrauch:</b>	Energieverbrauch	Kein Energieverbrauch
<b>Zelluläre Veränderungen:</b>	<p>Zellenzyme sind verantwortlich für charakteristische biochemische und morphologische Veränderungen mit:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Chromatin Kondensation</li> <li>• Karyorrhexis</li> <li>• DNA-Fragmentation</li> <li>• Selektive Proteindegradation durch spezifische Proteasen</li> <li>• Zellschrumpfung</li> <li>• Keine Schwellung der Mitochondrien</li> </ul>	<p>Biochemische und morphologische Veränderungen mit:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Schwellung des gesamten Zytoplasmas</li> <li>• Schwellung der Mitochondrien</li> <li>• Ungerichteter DNA-Verdau</li> </ul>

### 1.2.2 Morphologische Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose

Nekrose ist gekennzeichnet durch eine irreversible Schädigung der zellulären Plasmamembran, durch Schwellung und Ruptur der Zelle, Denaturierung und Koagulation von zytoplasmatischen Proteinen, Dysintegrität von Zellorganellen und Chromatinausflockung [39, 41]. Über eine Störung der Ionenkanäle kommt es zur Verschiebung des osmotischen Gradienten. Wasser strömt in die Zelle und lässt sie bis zur Zellyse anschwellen [42]. Sie behält jedoch bis zur späteren Phagozytose ihre ursprüngliche Form bei [41]. Die Ruptur der Membran führt zu einer Freisetzung von intrazellulären Komponenten und einer späteren Inflammation. Mehrere Zellen werden in den Prozess involviert und es folgt die Entstehung einer Fibrose mit Gewebsstrukturveränderungen [39]. 12 - 24 Stunden bevor die typischen Veränderungen der Nekrose Lichtmikroskopisch sichtbar werden, geht die Zelle zu Grunde [38].

Nekrose tritt nur unter pathologischen Bedingungen auf, z. B. unter dem Einfluss von Hypoxie, Hyperthermie, viralen Infektionen oder unter der Einwirkung von zahlreichen Toxinen und respiratorischen Giften [43].

Der Begriff Apoptose leitet sich von dem griechischen Wort *apoptosis* ab (Übersetzung: das Fallen der Blätter von Bäumen) und bezeichnet einen Vorgang mit folgenden morphologischen Kriterien: Chromatinkondensation, DNA-Fragmentation, Bildung von apoptotischen Körperchen und Zellyse. Apoptose wird durch ein Todessignal, entweder durch Freisetzung von Proteinen, Zellstrukturschädigung oder fehlender Stimulation, z. B. Hormonentzug, ausgelöst und dient der physiologischen Regulierung der Zellsynthese (s. *review* [44-47]).

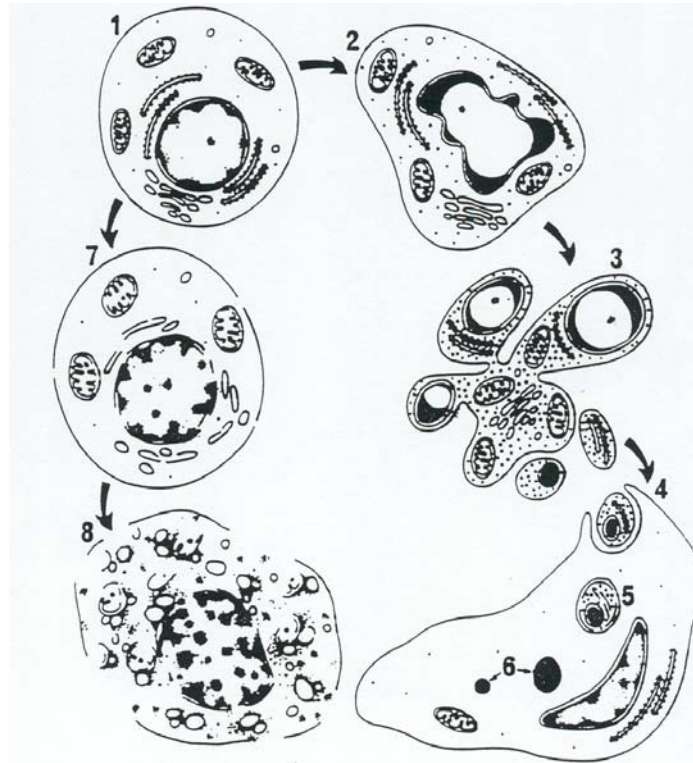
Erhält eine Zelle ein Todessignal, rundet sie sich zunächst ab und löst sich aus ihrem Zellverband. In der Regel kommt es zum Verlust spezieller Membranstrukturen wie Desmosomen und Mikrovilli. Das Endoplasmatische Retikulum (ER) dilatiert und bindet sich an die Zelloberfläche, die dadurch ein pocken-narbiges Aussehen erhält. Vesikel des ER entleeren ihren Inhalt unter

## Einleitung

Energieverbrauch in den Extrazellularraum, Wasser wird entgegen des osmotischen Gradienten ausgeschleust, dadurch verliert die Zelle 30 – 50 % ihres Volumens und schrumpft [42]. Die Mitochondrien erfahren eine Verdichtung ihrer Struktur, bleiben aber weitestgehend erhalten. Das Chromatin kondensiert und wird über Endonukleasen zuerst in Abschnitte von 50.000 – 200.000 bp, dann zu Oligonukleosomen von 180 – 200 bp Länge gespalten [42], die in der DNA-Strickleiter (*DNA-Laddering*) nachweisbar werden.

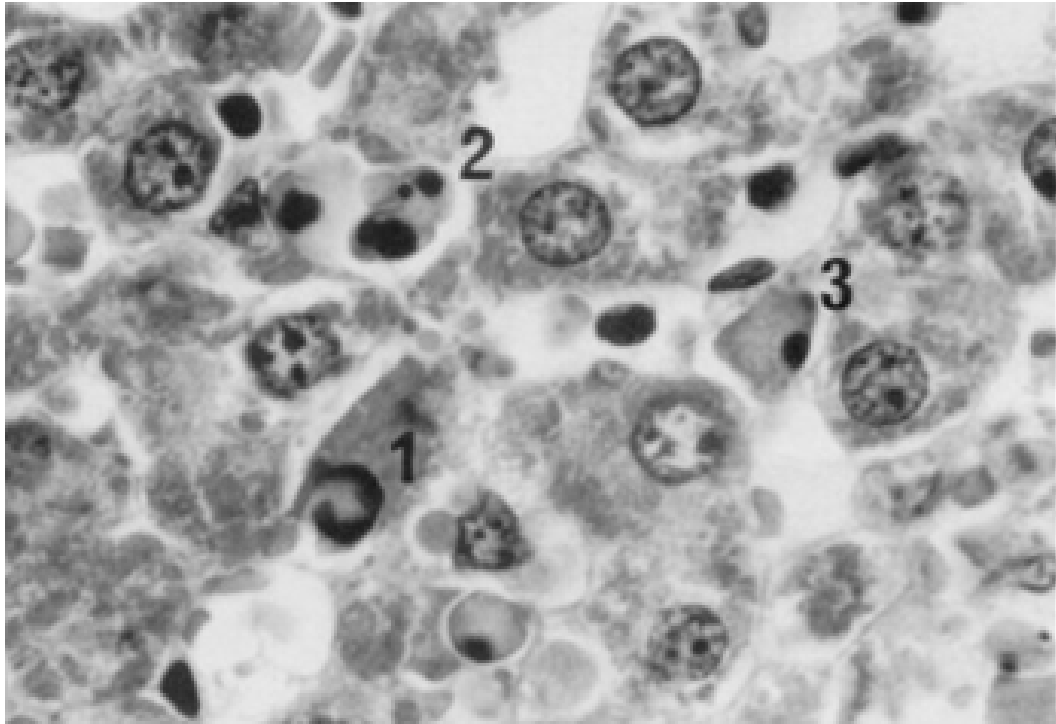
Im weiteren Verlauf stülpt sich das Zytoplasma in Bläschen vor und wird zu verschiedenen großen membrangebundenen Körpern abgeschnürt, den „*apoptotic bodies*“. Diese bilden sich bereits innerhalb weniger Minuten nach Beginn des Prozesses [41]. Physiologischerweise erfolgt die Phagozytose der „*apoptotic bodies*“ durch Nachbarzellen, unabhängig von Antikörpern oder Komplement, des Weiteren ohne Gewebeverletzung oder Inflammation (s. *review* [48]). Fehlt dieser Abbau der Zellreste, kann es sekundär ebenfalls zu einer Nekrose kommen [42].

Apoptose läuft in fast allen Geweben ab. Physiologisch spielt sie eine Rolle u. a. während der Embryogenese, der Regeneration von Epithelien, der Involutionsatrophie endokriner und lymphatischer Organe, der Entwicklung und Differenzierung von Lymphozyten, der Umbildung von Knorpel und Knochen während des Wachstums, der Entfernung von beschädigten und mutierten Zellen, der Eliminierung von aktivierten Leukozyten nach Infektionen u. a.. Sie trägt entscheidend dazu bei, die Zellhomöostase eines Individuums zu erhalten. Bei Dysregulation kann es zu Krankheiten wie Tumoren, Autoimmunkrankheiten, Organdysfunktionen, neurodegenerativen Erkrankungen etc. kommen [40].



**Abbildung 1: Morphologische Veränderungen von Apoptose und Nekrose**

nach [41]: 1. Normale Zelle. 2. Beginn der Apoptose: Formveränderung des Zellkörpers und des Nucleus, Verdichtung des Chromatins. 3. Der Nucleus zerfällt in mehrere Fragmente, Bildung der „apoptotic bodies“. 4. Die „apoptotic bodies“ werden von Nachbarzellen phagozytiert. 7. Beginn der Nekrose: Unregelmäßige Verklumpung des Chromatins, deutliche Anschwellung verschiedener Organellen und lokale Defekte in der Zellmembran. 8. Vollständige Desintegration der Membran und Organellen der Zelle. Die Zelle behält soweit ihre Form bei, bis sie phagozytiert wird.



**Abbildung 2: Elektronenmikroskopisches Bild von apoptotischen Zellen in verschiedenen Stadien**

nach [49], 1. Chromatinkondensation im Zellkern, 2. Bildung der „*apoptotic bodies*“ durch Abschnürung membrangebundener Körperchen, 3. „*apoptotic body*“



## 1.3 Apoptoseregulation

### 1.3.1 Möglichkeiten der intrazellulären Apoptoseregulation

Apoptose ist ein komplexer Vorgang, der durch verschiedene Faktoren induziert und beeinflusst werden kann [29, 50]. Bei der intrazellulären Signaltransduktion, die an der Auslösung des programmierten Zelltodes in manchen Zellen beteiligt ist, unterscheidet man einen intrinsischen/mitochondrialen (s. Abbildung 4) und einen extrinsischen Apoptoseinduktionsweg (s. Abbildung 5). Beide Wege können nicht unabhängig voneinander gesehen werden. Es bestehen zahlreiche Wechselwirkungen und Verbindungen.

Im Folgenden werden apoptoserelevante Proteine genannt, die in dieser Arbeit untersucht wurden:

- **Bax und Bcl-2:** Beide gehören der Bcl-2-Familie an, besitzen jedoch hinsichtlich Apoptose gegensätzliche Funktionen. Bax ist ein proapoptotisches Protein, Bcl-2 ein antiapoptotisches Protein (s. Abbildung 4, mitochondrialer Apoptoseinduktionsweg) [51, 52]. Entscheidend für die Homöostase einer Zelle ist das Mengenverhältnis von Bax und Bcl-2 zueinander (s. Abbildung 3).

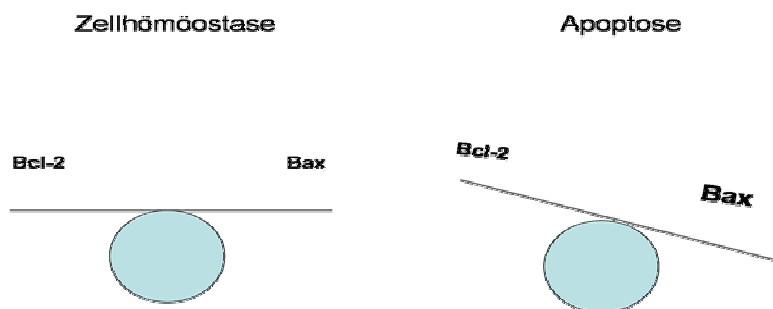
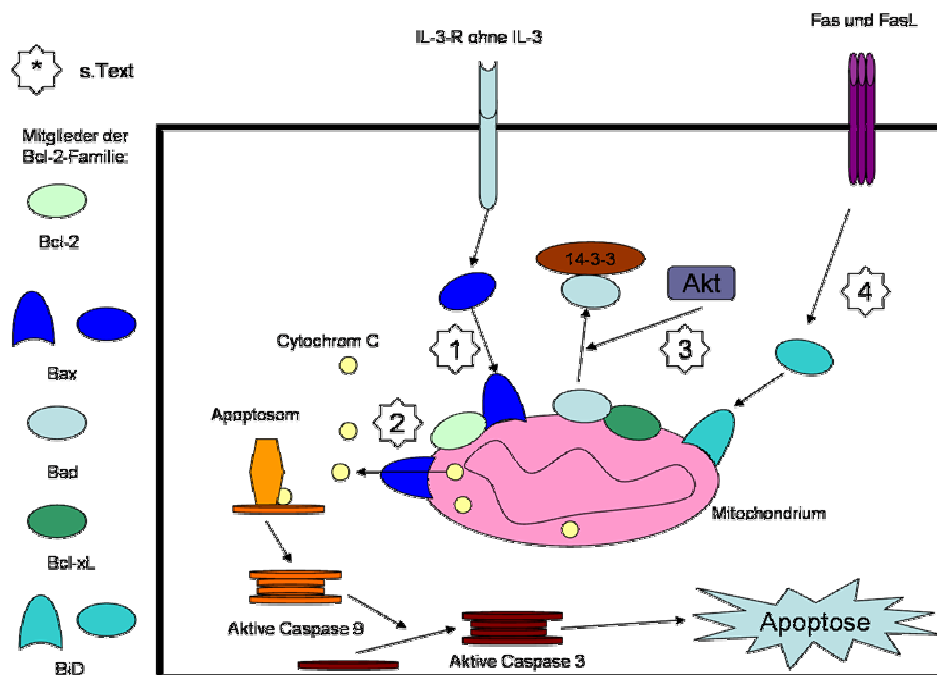


Abbildung 3: Gleichgewicht zwischen Bax und Bcl-2

## Einleitung

- **Caspase 3:** Caspase 3 steht am Ende der intrazellulären Signaltransduktionswege von Apoptose (z. B. dem intrinsischem und extrinsischem Apoptoseinduktionsweg s. Abbildung 4 und 5). Wird Caspase 3 aktiviert, führt es über seine Substrate zur Chromatinkondensierung, DNA-Fragmentierung und zum Kernzerfall [53-60].

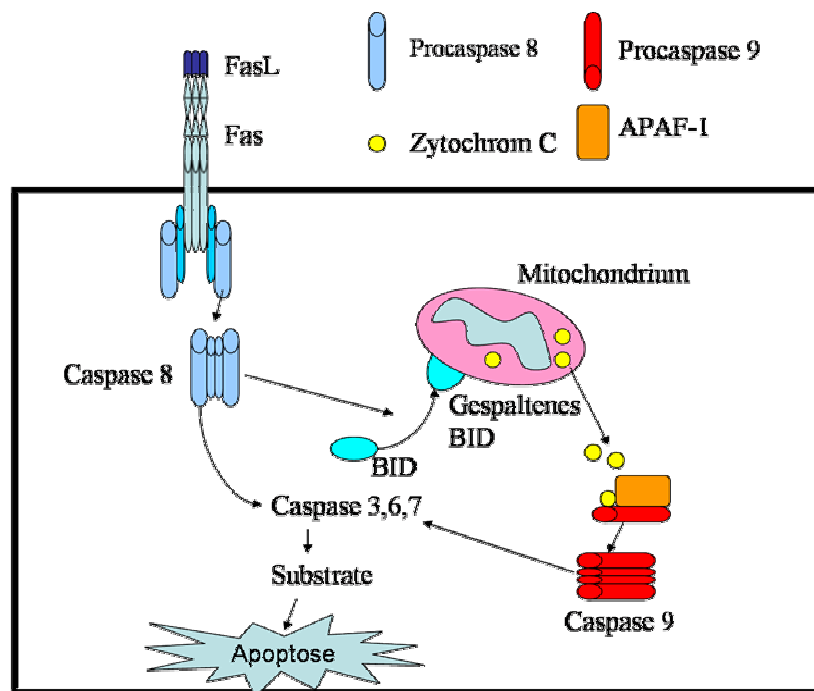


**Abbildung 4: Mitochondrialer Weg zur Auslösung von Apoptose**

modifiziert nach [61]. 1. Bestimmte Faktoren führen zur Konformationsänderung von zytoplasmatischem Bax, dieses bindet sich dann an die Mitochondrienmembran. 2. Mitochondriales Bax führt zur Freisetzung von Zytochrom C. Dieses bildet mit APAF-1 und Procaspase 9 einen Komplex, das Apoptosom. Caspase 9 wird aktiviert und kann seinerseits andere Caspasen durch Proteolyse aktivieren. 3. Das proapoptotische Mitglied Bad befindet sich an der Seite von Bcl-xL, einem Apoptosehemmer. Wird Bad gespalten durch den Einfluss von z. B. Akt, gibt es Bcl-xL frei und wird im Zytoplasma an ein zytoplasmatisches Protein (14-3-3-Protein) gebunden und damit gehemmt. Bcl-xL kann nun ungestört wirken. 4. Bid kann nach seiner Insertion an die Mitochondrienmembran ebenfalls Cytochrom C freisetzen oder proapoptotische Bcl-2-Familienmitglieder wie Bax dazu animieren.

## Einleitung

- **FasL** löst durch Bindung an seinen Rezeptor Fas in bestimmten Zellen einen intrazellulären Signaltransduktionsweg in Richtung Apoptose aus (s. Abbildung 5). FasL ist ein Transmembranprotein, das sich in löslicher Form im Interzellularspalt befindet und z. B. durch NFκB und Akt reguliert wird [62-65].

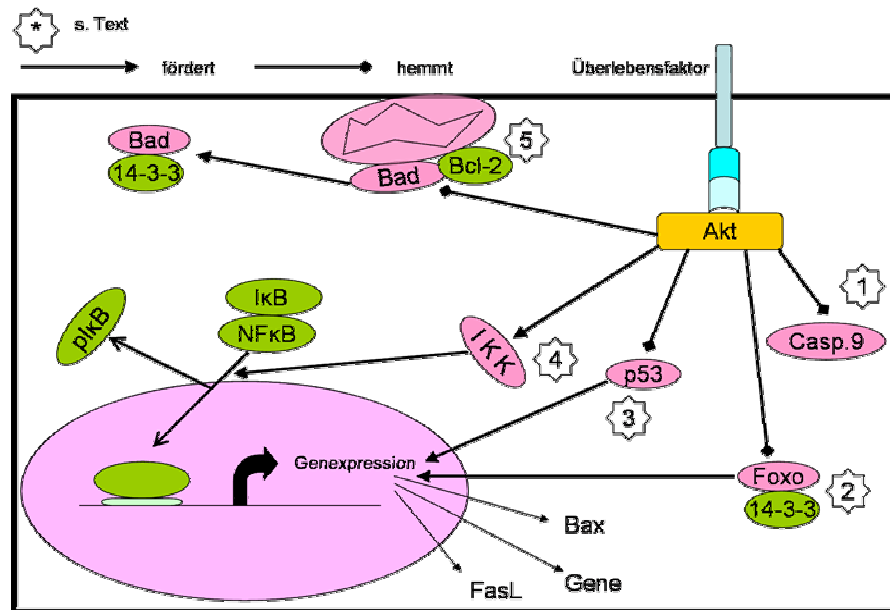


**Abbildung 5: Extrinsischer Apoptoseinduktionsweg**

mit Verbindung zum intrinsischen Weg, modifiziert nach [66]. Die Bindung von FasL an Fas führt über Einbindung eines Adaptermoleküls und Procaspase 8, zur Aktivierung von Caspase 8. Bei verschiedenen Arten von Zellen kann aktivierte Caspase 8 einen von zwei Pfaden einschlagen: In Typ I-Zellen (v. a. lymphoide Zelllinien) spaltet Caspase 8 Caspase 3 und 6 in ihre aktive Form [67]. In allen anderen Zelllinien ( Typ II ) spaltet Caspase 8 Bid [68], welches zu den Mitochondrien wandert und dort den intrinsischen Apoptoseinduktionsweg über Freisetzung von Zytocrom C auslöst [67].

## Einleitung

- Akt:** Die Funktion der Kinase Akt betrifft Zellmetabolismus, -wachstum, -überleben und Transkription. Akt hemmt nach heutigen Erkenntnissen in zahlreichen Zellen Apoptose über verschiedene Mechanismen (s. Abbildung 6) [69-71]

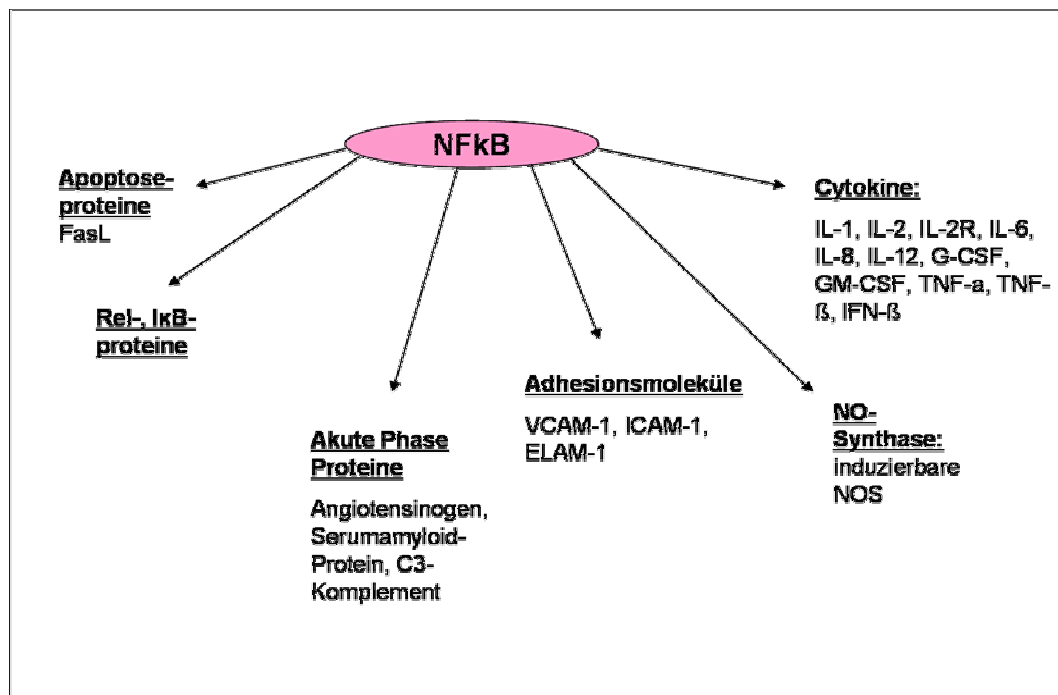


**Abbildung 6: Die zellulären Effekte von Akt**

modifiziert nach [69] und [72]. 1. Akt inaktiviert Caspase 9. 2. Akt führt zur Phosphorylierung von Mitgliedern der *Forkhead*-Familie (Foxo) und deren Sezernierung in das Zytoplasma. Ohne den Einfluss von Akt wandern die Mitglieder zum Nukleus und initiieren die Transkription von Genen, z. B. FasL. 3. Akt inhibiert p53. Aktives p53 ist in der Lage die Transkription von Genen zu induzieren, z. B. von Bax. 4. Akt kann den Inhibitor von kappa B-Kinase  $\alpha$  (IKK  $\alpha$ ) phosphorylieren. IKK  $\alpha$  kann wiederum selbst NFκB aktivieren durch die Abspaltung von IκB. 5. Akt phosphoryliert Bad. Dieses gibt an den Mitochondrien Bcl-xL oder Bcl-2 frei und bindet sich an einen zytoplasmatischen Inhibitor. Bcl-xL oder Bcl-2 können nun ungehindert proapoptotisch wirken.

## Einleitung

- **NFκB und IκB:** Der Transkriptionsfaktor NFκB reguliert die Expression von Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen, MHC-Antigenen und proinflammatorischen Enzymen, darunter FasL und iNOS (s. Abbildung 7) [73]. Im inaktivierten Zustand ist NFκB an IκB gebunden, dann ist sein Eintritt in den Nukleus und die Transkription der Gene nicht möglich. Dies geschieht jedoch, wenn IκB sich von NFκB trennt [74, 75].
- **iNOS:** iNOS ist die induzierbare Isoform der Stickstoffmonoxidsynthasen. Es gibt Hinweise darauf, dass iNOS durch die Bildung von NO an apoptotischen Vorgängen beteiligt ist [76-78].



**Abbildung 7: NFκB-regulierte Gene**

modifiziert nach [75], Ergänzungen [79-81]. Auszug von Genen, an deren Expression NFκB beteiligt ist.

### 1.3.2 Caspase 3

Die Caspasen (*Cysteine containing asp asen*; syn. CPP 32, Apopain, Yama) wurden mit apoptotischen Prozessen nach Analyse der Gene von *Caenorhabditis elegans* (Nematode) und der Erkenntnis der Verwandtschaft dieser Gene mit Erbmaterial von Säugetieren in Zusammenhang gebracht (s. *review* [82, 83]). Bisher wurden mehrere Säugetier-Caspasen und deren Funktion hinsichtlich Apoptose oder Inflammation beschrieben.

Alle Caspasen existieren in einer inaktiven Form, die auch Procaspase genannt wird. Durch proteolytische Spaltung werden sie über eine Konformationsänderung zum aktiven Enzym (s. *review* [84, 85]). Auslöser dieser limitierten Proteolyse sind z. B. Rezeptor- (s. Abbildung 5) oder mitochondrienabhängige Wege (s. Abbildung 4), Stressfaktoren, die zu einer DNA-Schädigung führen, des Weiteren inflammatorische Zytokine oder Veränderungen der Zellhomöostase z.B. bei Ischämie und Hypoxie [86]. Die Aktivierung einer Caspase erfolgt dann entweder über eine andere Caspase oder wird von anderen Faktoren (z. B. anderen Proteinen) induziert [87].

Caspase 3 spielt eine zentrale Rolle in der Apoptose. Sie setzt den Großteil der Substrate um, die zur Chromatinkondensierung, DNA-Fragmentierung und zum Kernzerfall führen (s. *review* [53]). Die Substrate der Caspase sind u. a. Proteine des Zytoskeletts, Kinasen und DNA-Reparaturenzyme sowie Apoptoseinhibitorproteine [54-58].

### 1.3.3 Bax und Bcl-2

Bcl-2 und seine verwandten Proteine (s. *review* [51] [88]), sind in der Lage, Apoptose entweder zu induzieren oder zu hemmen, durch Beeinflussung der äußeren mitochondrialen Membran für die Durchlässigkeit von bestimmten Faktoren, z. B. Zytochrom C [85]. Zytochrom C befindet sich normalerweise

## Einleitung

zwischen innerer und äußerer Membran der Mitochondrien. Wird es durch die Wirkung der proapoptotischen Proteine aus den Mitochondrien ausgeschleust, kann es eine Caspasenkaskade und damit programmierten Zelltod auslösen [89] (s. Abbildung 4).

Der Namensgeber der Bcl-2-Familie (B-cell-lymphoma-2) wurde 1989 entdeckt. Es war das zweite Onkogen, das in einem menschlichen B-Zell-Lymphom entdeckt wurde [90]. Die Größe von Bcl-2 beträgt 26 kDa, es ist antiapoptotisch wirksam und in zahlreichen Geweben nachweisbar [59]. Die antiapoptotischen Mitglieder der Familie sind Integralmembranproteine im Mitochondrium, im endoplasmatischen Retikulum und in der Kernmembran [91]. Bcl-2 kann die Wirkung von Bax über verschiedene Wege antagonisieren und damit die Caspaseaktivierung verhindern [90, 92, 93].

Sein Gegenspieler Bax wurde entdeckt durch Co-Immunoprecipitation mit Bcl-2 [60]. Bax ist ein 21 kDa großes Protein und ebenfalls im Zytoplasma, im Mitochondrium und im endoplasmatischen Retikulum nachweisbar [94, 95]. In lebenden Zellen ist Bax monomerisch im Zytosol gelegen. Erhält die Zelle ein Todessignal, transloziert und dimerisiert Bax [96, 97]. Es wird zum Integralprotein im Mitochondrium und sorgt für die Freisetzung von Zytochrom C aus dem Zellorganell [98].

### 1.3.4 FasL

Apoptotische intrazelluläre Mechanismen können durch extrazelluläre Faktoren in Gang gesetzt werden, z. B. durch Bindung von Liganden an ihre Membranrezeptoren, den sogenannten Todesrezeptoren [99]. Zu diesen Faktoren gehört FasLigand (FasL, syn. APO-1L, CD 95L = *cluster of differentiation 95L*) und sein Rezeptor Fas (= griech.: das von Göttern erlaubte, syn. = APO-1, CD 95). Bindet FasL an Fas, kommt es zur Auslösung von intrazellulären Mechanismen, die zur Aktivierung von Caspase 8 und damit zur Auslösung von Apoptose führen (*kiss of death*) (s. Abbildung 5 u. *review* [62, 63]). FasL wird auf

## Einleitung

Grund seines Aufbaus zur Gruppe des Tumornekrosefaktors (TNF) gezählt [100] und besitzt eine Größe von 37 kDa [101]. Es ist ein Membranprotein, das sich auch in löslicher Form im interzellulären Milieu befindet. Die lösliche Form verursacht möglicherweise die Blockierung von Fas durch Bindung an Fas ohne Vermittlung eines „Todessignals“ [64].

Die Expression von FasL wird durch verschiedene Mechanismen reguliert (z. B. durch den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B) [81, 102]. In zahlreichen Geweben ist das Fas/FasL-System unter physiologischen und pathologischen Bedingungen relevant:

- Es dient zum Ausgleich der Zellhomöostase, z. B. zur Entfernung von Epithelzellen [103] und reifer Lymphozyten nach Beendigung der Inflammation [63].
- FasL wird vor allem von zytotoxischen T-Zellen und Natürlichen Killerzellen, zur Abwehr von Bakterien, Viren und karzinomatösen Zellen gebildet. Des Weiteren wird es von Monozyten und Makrophagen exprimiert [104].
- In Auge und Testis dient die Bildung von FasL der Abwehr von Immunzellen. Das FasL-tragende Gewebe bewirkt in den Fas-präsentierenden Lymphozyten die Auslösung des programmierten Zelltodes [105].
- Die Produktion von FasL in Tumorzellen verhindert die Eliminierung der Zellen durch Leukozyten, wahrscheinlich durch Apoptose-Aktivierung in den Immunzellen [106].
- Die Dysregulation von Fas/FasL führt zu einigen Erkrankungen (Autoimmunerkrankungen, Leukämien, chronisch viralen Infektionen) und bietet dadurch mögliche therapeutische Ansatzpunkte [107].



### 1.3.5 Akt

Bei Akt handelt es sich um eine Serin-Threonin-Kinase, die in drei Isoformen existiert. Die Funktion von Akt (auch PKB = protein kinase B- oder RACPK = *related to A and C protein kinase*) in einer Zelle betrifft den Einfluß auf Zellmetabolismus, -wachstum, -überleben und Transkription [71]. Akt unterdrückt in zahlreichen Zellarten Apoptose, die ausgelöst wird durch DNA-Schädigung, Zelladhäsionsverlust, Zellzyklusstörungen u. a. [69, 70]. Die Stimulierung von Akt erfolgt über verschiedene Mechanismen (s. *review* [108]). Stimuli wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Hypoxie und eine erhöhte Druckbelastung induzieren z.B. im Herzen Apoptose. Spezifische Hormone, Wachstumsfaktoren und Zytokine wurden identifiziert, die kardioprotektiv vor z.B. einer Ischämie wirken. Die meisten der protektiven Faktoren erreichen das über eine Aktivierung von Akt [109].

Akt kontrolliert Zellüberleben durch die direkte, transkriptionelle und metabolische Regulation bestimmter Faktoren (s. Abbildung 6).

- Akt ist in einigen Geweben befähigt, ein proapoptisches Protein der Bcl-2-Familie, zu phosphorylieren. Die antiapoptischen Bcl-Mitglieder Bcl-xL und Bcl-2 werden dadurch freigesetzt und können nun ungehindert wirken und das Zellüberleben fördern [70].
- Akt phosphoryliert und inaktiviert die proapoptische Caspase-9, eventuell an seinem katalytischen Zentrum [110].
- Aktivierte Proteine der *Forkhead*-Familie regulieren Apoptose durch Transkription von Todesgenen, z. B. FasL. In Abwesenheit von Überlebensfaktoren wandern die *Forkhead*-Familienmitglieder zum Zellkern und initiieren die Genexpression. Überlebensfaktoren führen mittels Akt zu deren Inaktivierung und Sezernierung in das Zytoplasma [65].

## Einleitung

- Akt ist in der Lage, IKK  $\alpha$  (I-kappa-B-Kinase- $\alpha$ ) zu phosphorylieren. IKK  $\alpha$  kann ihrerseits NF $\kappa$ B aktivieren durch Abspaltung von I $\kappa$ B [111].
- p53 wird durch Akt inhibiert. Aktives p53 ist befähigt, die Transkription von bestimmten Genen zu induzieren, z. B. der proapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder wie Bax.

### 1.3.6 NF $\kappa$ B und I $\kappa$ B

Nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) steht für eine Gruppe von Homo- oder Heterodimeren aus strukturell verwandten Proteinen der NF $\kappa$ B/Rel-Familie. NF $\kappa$ B wurde ursprünglich als ein Transkriptionsfaktor für B-Zell-spezifische Genexpression beschrieben, der an den „*Enhancer*“ der  $\kappa$ -Kette des Immunglobulins bindet [112]. Heute ist sein Einfluss auf zahlreiche Gene und sein ubiquitäres Vorkommen in verschiedenen Geweben bekannt. Aktivatoren von NF $\kappa$ B sind z. B. Mikroorganismen, Zytokine und oxidativer Stress. NF $\kappa$ B reguliert die Expression von Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen, MHC-Antigenen und proinflammatorischen Enzymen (s. Abbildung 7) (s. *review* [73]). Aktives, DNA-bindendes NF $\kappa$ B ist ein Dimer aus zwei Proteineinheiten [113]. Am häufigsten wurde das Dimer aus p50 und RelA (p65) studiert, auch wenn einige andere Homo- und Heterodimere beschrieben werden konnten [113]. Der Unterschied der NF $\kappa$ B-Dimere soll in der Fähigkeit liegen, differente DNA Ziele zu erkennen und damit Genexpression unterschiedlich zu regulieren. Weitere Unterschiede beinhalten Zelltyp-Spezifität, differente zelluläre Lokalisationen, ungleiche Interaktionen mit I $\kappa$ B und divergierende Aktivierungswege [113].

In ruhendem Zustand ist NF $\kappa$ B im Zytoplasma an I $\kappa$ B (Inhibitor of Nuclear factor  $\kappa$ B) gebunden, dadurch wird sein Eintritt in den Nukleus und die folgende DNA-Bindung verhindert. Unterschiedliche I $\kappa$ B-Varianten sind beschrieben [75].

## Einleitung

Durch z. B. Phosphorylierung, Ubiquitylierung und Degradation von I $\kappa$ B wird NF $\kappa$ B von I $\kappa$ B getrennt und NF $\kappa$ B kann die Transkription von Genen fördern [74].

### 1.3.7 iNOS

iNOS (induzierbare NO-Synthase, syn. NOS2) ist die induzierbare Isoform der Familie der Nitritoxidase Synthasen (NOS), welche die Bildung von NO (Stickstoffmonoxid) aus L-Arginin katalysieren [114]. Eine gesteigerte Produktion von NO nach Induktion durch iNOS ist vermutlich verantwortlich für die kardiale Dysfunktion bei zahlreichen Erkrankungen, wie das SIRS (systemic inflammatory response syndrom), der entzündlichen Myokarditis, kardialer allogener Abstoßung und einige andere Formen des kardialen Organversagens [115].

NOS existiert in drei Isoformen: induzierbare NOS (iNOS), endotheliale NOS (eNOS) und neuronale NOS (nNOS oder bNOS= brain NOS). Alle drei werden durch verschiedene Gene codiert [76, 77]. Im gesunden Herzen sind bNOS and eNOS in basalem Level präsent- bNOS in kardialen Ganglion- und Nervenzellen und eNOS in Arterien, Venen und Kapillaren- während alle drei Isoformen im kranken Herzen messbar sind [77]. Die Expression von iNOS als Folge der Stimulation durch Zytokine wurde ursprünglich in Makrophagen beobachtet, es war beteiligt an der durch NO-verursachten Zellschädigung und Apoptose. iNOS mediiert die zytostatische und zytotoxische Effektorfunktion von aktivierten Makrophagen und kann eine große Menge an NO produzieren [116]. Weiterhin ist bekannt, dass iNOS unter bestimmten Bedingungen auch von glatten Muskelzellen, Kardiomyozyten [117] und Endothel [77] expremiert wird und die Induktion von Apoptose durch Synthese von NO in mehreren Zellarten zur Folge hat [78].

### 1.4 Fragestellung

Physiologischerweise gibt es ein Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und Zelltod. Dieses Gleichgewicht spielt eine entscheidende Rolle für den Erhalt der Gewebshomöostase. Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, stellt einen physiologischen Prozess zur selektiven Eliminierung von unerwünschten körpereigenen und -fremden Zellen dar. Es gibt Hinweise darauf, dass Apoptose auch bei akuter Abstoßung von Bedeutung ist [118-120]. In dieser Arbeit wurden Apoptose und die biochemischen Signalwege des programmierten Zelltodes an einem etablierten, vollständig allogenen Rattenherztransplantationsmodell untersucht.

Schwerpunkt der vorliegenden Untersuchung liegt auf folgenden Fragestellungen:

- Kommt es im Verlauf der akuten Abstoßung in dem hier verwendeten Rattentransplantationsmodell zur Apoptose? Wenn ja, in welchen Zellen (Kardiomyozyten oder Immunzellen) und in welchem Ausmaß?
- Welche Mechanismen mit Apoptoseinduzierenden oder –hemmenden Faktoren spielen dabei eine Rolle? Folgende Faktoren wurden dazu untersucht und ihr möglicher Einfluß aufeinander erörtert: iNOS, Bax, Bcl-2, FasL, Akt, NFκB, IκB, Caspase 3, Procaspase 3

## 2 Material und Methode

### 2.1 Tiermodell

In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurde das Wistar-Furth (WF, RT1<sup>U</sup>) zu Lewis (LEW, RT1<sup>L</sup>) heterotope, allogene Transplantationsmodell verwendet. Das heterotope Modell ist das Standardmodell für immunologische Untersuchungen seit den 70iger Jahren [121]. Männlichen WF-Inzuchtratten wurden Herzen entnommen und heterotop männlichen LEW-Inzuchtratten implantiert. Die Organe wurden an die großen Bauchgefäße angeschlossen, in einem „*Non-working-heart*“-Modell. Dieses Modell ist optimal für immunologische Prozesse. Nach erfolgter Transplantation wird das arterielle Blut dem Transplantat via *Aorta abdominalis* in den Aortenstumpf zugeführt. Der linke Ventrikel wird retrograd gefüllt, und die Koronarien, die direkt oberhalb der Semilunarklappen an der Aorta im sogenannten *Bulbus aortae* entspringen, werden gleichzeitig mit dem arteriellen Blut versorgt. Damit ist die Sauerstoffversorgung des Herzmuskels durch die Koronarien über das kapillare Bett gegeben. Auf der venösen Seite des Kapillarsystems wird das Blut gesammelt und gelangt über den *Sinus coronarius* in den rechten Vorhof und danach in den rechten Ventrikel. Von dort wird das Blut über die venöse Anastomose über den Stumpf des *Truncus pulmonalis* in die *Vena cava caudalis* geleitet.

Die beiden Tierstämme unterschieden sich vollständig in ihren MHC-Ausprägungen (allogene Transplantation). Um akute Abstoßung innerhalb von Tagen zu erreichen, wurde den Empfänger-Tieren keine Immunsuppression verabreicht. In einem in-vivo Versuch wurde der optimale Abstoßungszeitpunkt der Transplantate bestimmt. Darauf aufbauend konnte dann der Zeitpunkt definiert werden, wann die Organentnahme für die in-vitro Versuche erfolgen sollte um die Frühphase, die Intermediärphase und die Spätphase der Abstoßung untersuchen zu können. Zum Vergleich dienten für alle in-vitro Versuche

## Material und Methode

nichttransplantierte WF-Ratten-Herzen und sowie Isotransplantate (LEW zu LEW). Auf eine intraoperative Antibiotikaprophylaxe wurde verzichtet. Während der gesamten Studie wurden keine Infektionen beobachtet.

### **2.1.1 Herkunft und Betreuung der Tiere**

Als Spendertiere dienten männliche Ratten des Inzuchtstammes Wistar-Furth (WF, RT1<sup>U</sup>) mit einem Gewicht von 175-225g. Als Empfängertiere wurden männliche Ratten des Inzuchtstammes Lewis (LEW, RT1<sup>L</sup>) mit einem Gewicht von 300-325g verwendet. Die Tiere wurden vom Tierzuchtlabor Harlan Winkelmann (Borchen) bezogen. Mit Ausstellung eines Gesundheitszeugnisses versicherte das Labor, dass die Ratten sich bei Lieferung im gesunden Zustand befanden. Die Haltung der Tiere erfolgte in einem klimatisierten Tierstall mit konstantem Tag-Nacht-Rhythmus, betreut von einer ausgebildeten Tierpflegerin. Maximal zwei Tiere wurden in Käfigboxen gehalten, mit freiem Zugang zu Wasser aus Trinkflaschen und pelletierter Fertignahrung (Altramin, Labortierservice, Lippe).

### **2.1.2 Versuchsgenehmigung**

Die „Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren“ wurde uns unter dem Aktenzeichen VI 63-19c20-15 (1) GI 20/10-Nr. 38/2002 erteilt.

### **2.1.3 Heterotopes, allogenes Transplantationsmodell**

#### **2.1.3.1 Vorbereitung**

Alle Eingriffe wurden an narkotisierten Tieren durchgeführt mit Verwendung von inhalativen Isofluran (Forene, Abbott, Wiesbaden) und Ketamin (Ketanest, Insera, Freiburg: 10 mg/100 g KG i. m.) in Kombination mit Xylazinhydrochlorid (Rompun, Bayer, Leverkusen: 1.0 mg/100 g KG i. m.) als Anaesthetikum.

Die narkotisierten Tiere wurden im Bereich des Thorax und Abdomens rasiert und in Rückenlage fixiert.

#### **2.1.3.2 Operationsprotokoll der Herztransplantation**

Nach Erreichen einer adäquaten Narkosetiefe mit vollständiger Analgesie erfolgte die mediane Laparatomie. Das Darmkonvolut wurde in mit Kochsalzlösung (isotone NaCl-Lösung, Roth, Karlsruhe) getränkten Kompressen nach extraabdominal mobilisiert.

Die großen Bauchgefäße, Aorta abdominalis und Vena cava caudalis wurden dargestellt und mit Haltefäden, Perma-Handseide<sup>®</sup> (Ethicon, Brüssel, Belgien, schwarz, geflochten, 4-0) umschlungen. In die so freigelegten Gefäße wurde mittels einer mikrochirurgischen Schere eine Incision gesetzt. Die für die Anastomose verwendeten Nadel-Faden-Kombinationen, Prolene<sup>®</sup> (Ethicon, 0,5 metric, 7-0) wurden schon mit dem ersten Stich an den Gefäßen befestigt, um so die Positionierung des Transplantates zu erleichtern.

Parallel wurde das Spendertier betäubt (Isofluran, per Inhalationem) und das Herz entnommen. Hierbei wurden nach medialer Laparatomie und anschließender Durchtrennung des Zwerchfells sämtliche Rippen möglichst dorsal durchtrennt und das Herz freigelegt. Alle Gefäße des Herzens wurden bis auf den Truncus Pulmonalis und die Aorta descendens mit Perma-Handseide<sup>®</sup> legiert. Die großen

## Material und Methode

Gefäße, über die später das Transplantat an das Empfängertier anastomosiert wurde, wurden mit einem schnellen Scherenschlag, möglichst gerade, durchtrennt. Ab diesem Zeitpunkt begann die Ischämiezeit. Das entnommene Herz wurde mit ca. 3 - 5 ml einer Pufferlösung antegrad durch die Aorta perfundiert, wobei sich das Herz blass färbte und die Herzgefäße „ausgewaschen“ wurden. Dabei wurden mit der Kanülenspitze die Klappen, sowohl die Gefäßklappen wie auch die Atrioventrikularklappen, zerstört. Das Herz wurde während der Ischämie in mit Pufferlösung getränkter Gaze feucht gehalten.

Das entnommene Herz wurde anschließend nach der Technik von ONO et al.[121], modifiziert nach SCHMID et al. [122] mittels mikrochirurgischer Technik End-zu-Seit an die großen Bauchgefäße des Empfängertieres angeschlossen.

Dabei wurde jeweils eine fortlaufende Naht benutzt. Nach Freigabe der Blutzirkulation füllten sich die Koronarien sofort mit Blut und innerhalb der ersten Minute begann das Herz spontan zu schlagen.

Mit der Reperfusion des Transplantats endete die Ischämiezeit, die ca. 25 Minuten ( $24,7 \pm 2,1$  min.) dauerte. Anschließend wurde die Bauchdecke des Empfängertieres zweischichtig vernäht (die Naht des Musculus rectus abdominis und die Hautnaht erfolgte mit 3-0 Vicryl-Fäden (Ethicon)).

### **2.1.3.3 Überwachung der Transplantatfunktion**

Zur Feststellung des definitiven Abstoßungszeitpunkts wurde täglich die Transplantatfunktion palpatorisch beurteilt (n=7 Iso- und Allotransplantate) und eingestuft in einen Score mit vier Gradeinteilungen (s. Tabelle 2).



**Tabelle 2: Palpationsscore**

Grad 3:	Kräftige, rhythmische Kontraktionen palpabel; bei narkotisierten Tieren sieht man das Transplantat durch die Bauchdecke schlagen
Grad 2:	Rhythmische Kontraktionen palpabel
Grad 1:	Minimale palpable Kontraktion; nach Abdomeneröffnung rhythmische Restaktivität zu sehen
Grad 0:	Keine palpablen Kontraktionen; nach Eröffnung des Abdomens keine Aktivität des Transplantates mehr zu sehen

### 2.1.3.4 Operationsprotokoll der Gewebeentnahme

Die transplantierten Herzen wurden den Empfängertieren zu definierten Zeitpunkten (an Tag 1, 3, 6 nach Transplantation, n=4 je Gruppe) entnommen und weiter aufbereitet.

Unter Isoflurannarkose wurde bei dem auf dem Rücken fixierten Tier ein vom Xiphoid nach kaudal verlaufender, etwa 10 cm langer Schnitt gelegt und das Abdomen eröffnet. Dann wurde das transplantierte Herz entnommen. Die Herzspitze wurde abgetrennt und in 4 gleich große Gewebestücke geteilt. In 2,0 ml Eppendorfhütchen (Safe-Lock-Tubes<sup>®</sup>, Eppendorf, Hamburg) wurden sie bei – 80 °C aufbewahrt. Das restliche Organ wurde transversal in 3 gleichgroße Teile geteilt und mittels Tissue-Tek<sup>®</sup> (O.C.T., 4583 Compound, Sakura Fine Technical) auf Korkplättchen (Roth, Karlsruhe) aufgebracht, vollständig mit dem Gewebekleber bedeckt und anschließend wurde das Präparat in Isopenthan (primäres Kryogen, Roth, Karlsruhe) schockgefroren. Die Probe wurde bei - 80 °C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

## 2.2 Histologie/ Immunhistochemie

### 2.2.1 Gewebefärbung mit Elastika-Hämatoxylin-Eosin

Von den schockgefrorenen Gewebeproben (n=4/Gruppe) wurden an einem Kryostat (CM 1900, Leica, Wetzlar) 6 µm dicke Gewebeschnitte auf Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden die Präparate in gekühltem Aceton (4 °C, Merck, Darmstadt) für 10 min fixiert und sofort bei –20 °C eingefroren.

Zur Beurteilung der Gewebeschnitte wurde eine konventionelle Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (Hämalaun<sup>®</sup> und Eosin, Merck, Darmstadt) kombiniert mit einer Elastica van Gieson-Färbung (Resorchin-Fuchsin, Chroma, Köngen) durchgeführt (s. Tabelle 3). Die Beurteilung der Präparate erfolgte mit einem Lichtmikroskop der Fa. Leica (DMRB, Wetzlar).

**Färbeprotokoll Elastica-Hämatoxylin-Eosin** (s. Tabelle 3):

- 20 min Resorcin-Fuchsin-Lösung (Chroma, Köngen)
- 1 min mit H<sub>2</sub>O spülen
- 1 min 96 % Ethanol
- 1 min 70 % Ethanol (Ethanol absolut, Sigma-Aldrich, Seelze)
- spülen mit destilliertem H<sub>2</sub>O (Aqua ad iniectabilia = A.dest, Baxter, Unterschleißheim), 5 min in Aqua dest. stehen lassen
- 5 min in Hämalaun<sup>®</sup>-Lösung (Mayers Hämalaunlösung, Merck, Darmstadt)
- spülen in Aqua dest.
- 5 min in Leitungswasser bläuen
- 45 sek in Eosin
- kurz in Aqua dest. spülen
- Aufsteigende Alkoholreihe: 1 min 70 % Ethanol, 1 min 70 %, 2 x 1 min 96 %, 1 min in 100 %, 1 min in 100 % Ethanol
- Einbetten in Glycergel (Mounting Medium, Dako, Hamburg), abdecken

**Tabelle 3: Lösungen für die Elastika-Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Eosin-Gebrauchslsg.	1 Teil Eosin-Lsg. (2 g Eosin (Merck, Darmstadt) in 100 ml 96 %-Alkohol) 1 Teil 70 %-Alkohol (Ethanol absolut, Sigma-Aldrich, Seelze) 5 Trpf. Eisessig/100 ml (Merck, Darmstadt)
---------------------	---

### 2.2.2 Immunhistochemische Färbung von iNOS

Bei der immunhistochemischen Färbung werden spezifische Antigene mit Antikörpern markiert und mit einem Detektionssystem dargestellt. Um die Reaktion eines Antigens mit einem spezifischen Antikörper sichtbar zu machen, wird der Antikörper an ein Enzym gekoppelt, welches anschließend bei entsprechendem Substratzusatz eine Färbereaktion auslöst. Man unterscheidet eine direkte und indirekte Färbemethode. Bei der direkten Methode wird ein Antikörper verwendet, der spezifisch gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet ist. Bei der indirekten Methode werden zunächst unkonjugierte Antikörper an ein Antigen gebunden, die im zweiten Schritt mit einem enzymgekoppelten Sekundärantikörper reagieren.

Zu den indirekten Verfahren gehört auch die hier verwendete Methode. Dabei wird die Bindung des Primärantikörpers an das Antigen indirekt über die Färbereaktion des Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplexes (APAAP-Komplex, Dako, Hamburg) mit einem Substrat nachgewiesen. Bei dieser Methode werden 3 Antikörperlösungen eingesetzt: der Primär-Antikörper, der Brücken-Antikörper (Sekundärantikörper, er verbindet den Primär-Antikörper mit dem APAAP-Komplex) und der APAAP-Komplex (Enzym-Immunkomplex, bestehend aus alkalischer Phosphatase und anti-Alkalischer Phosphatase Antikörper). Zur Visualisierung der gebundenen Antikörper wurden die Präparate in eine neufuchsinhaltige Lösung gegeben. Durch die Phosphatgruppe am Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-

## Material und Methode

Phosphatase-Komplex wurde hierbei eine Neufuchsin-Diazo-Färbereaktion (Enzym-Substrat-Reaktion) katalysiert.

**Tabelle 4: Lösungen der Immunhistologie**

Waschlösung	18 g Tris-Base (Sigma, Deisenhofen) 137 g Tris-HCl (USB, Cleveland, USA) 175 g NaCl (Roth, Karlsruhe) ad 20 l A.dest (Baxter) pH 7,4 - 7,6
Neufuchsin-Lsg.	187,5 µl 5 % Neufuchsin (Aldrich Chemie) 19,2 mg Na-Nitrit (Fluka) in 480 ml A. dest (Baxter) + 66 ml Entwicklungs-Trispuffer 23,25 ml AMPD 37,5 µl Levamisol + 46,5 mg Naphthol-AS-Bi-phosphat (Fluka) 562,5 µl N,N-Dimethylformamid (Sigma)]
0,05 M Entwicklungs- Trispuffer	4,9 g Tris-Base (Sigma) 1,5 g Tris-HCl (Sigma) 8,7 g NaCl (Serva) ad 1 l A. dest (Baxter) pH 8,7
AMPD-Levamisol- Lsg.	25 mg Levamisol (Sigma) 15,5 ml 0,2 M-2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol
0,2 M-2-Amino-2- methyl-1,3-propand.	21 g AMPD (Serva) 1 l A. dest (Baxter)
5 % Neufuchsin	5 g Neufuchsin (Aldrich-Chemie) 100 ml HCl (2N, Roth)

**Tabelle 5: Antikörper der Immunhistologie**

Anti-iNOS	Rabbit-anti-rat IgG, Dianova (Hamburg), Verdünnung 1:500
Verbindungs-AK	Rabbit-anti-mouse IgG, Dako (Hamburg), Verd. 1:200
Zweit-AK	Mouse-anti-rabbit IgG, Dako (Hamburg), Verd. 1:500

### **Färbeprotokoll iNOS (s. Tabelle 4 und 5)**

- Inkubation der Präparate für 45 min mit iNOS und verdünntem Rattenserum (1:750, Sigma, Deisenhofen)
- mehrmaliges Spülen mit der Waschlösung
- 20 min inkubieren mit dem Zweitantikörper, einem Verbindungsantikörper und verdünntem Rattenserum
- mehrmaliges Spülen mit der Waschlösung
- Zugabe des APAAP-Komplexes (1:50, Dako, Hamburg), 20 min inkubieren
- mit H<sub>2</sub>O spülen
- die Präparate für 30 min in eine Neufuchsinhaltige Lösung geben
- erneutes Spülen mit H<sub>2</sub>O
- Gegenfärbung mit Hämalaun<sup>®</sup> (Merck, Darmstadt) für 25 sec
- Bläuen unter Leitungswasser

Anschließend erfolgte die Analyse der Präparate an einem Lichtmikroskop (Leica DMRB, Wetzlar). Es wurden 20 unterschiedliche Gesichtsfelder (10 pro Ebene) bei 400 facher Vergrößerung ausgezählt. Als Positivkontrolle dienten mit LPS-stimulierte kardiale Präparate (Lipopolysaccharid, Sigma-Aldrich, Deisenhofen).

### 2.3 Apoptosenachweis

In apoptotischen Zellen schneiden endogene Nukleasen die nukleäre DNA in den Bereichen zwischen den Nukleosomen. Die Größe der entstehenden Fragmente beträgt ca. 180 bp (= der Größe eines Nukleosoms) oder ein Vielfaches davon. Diese DNA-Fragmentierung (Strangbrüche) ist ein charakteristisches Merkmal für Apoptose und kann damit zur Identifizierung apoptotischer Zellen und deren Differenzierung zu nekrotischen Zellen herangezogen werden.

#### 2.3.1 DNA-Laddering

Die Fragmentierung der nukleären DNA zu Mono- und Oligonucleosomen kann durch Analyse der DNA auf einem mit Ethidiumbromid versetztes Agarosegel gezeigt werden (DNA-Strickleiter, DNA-Laddering). Sind in der untersuchten Population Zellen apoptotisch, erscheint nach Färbung des Geles ein charakteristisches, leiterähnliches Bandenmuster, eine sogenannte DNA-Strickleiter. Unfragmentierte DNA stellt sich als durchgängiger „Schmier“ dar. Erkennbar werden die Banden durch Zugabe eines fluoreszierenden, interkalierenden Farbstoffes (Ethidiumbromid).

Die DNA wurde mit Hilfe eines DNA Laddering Kits (Tacs, R&D Systems, Wiesbaden) aus dem Herzgewebe, entsprechend der Anleitung des Herstellers, isoliert. 10 µg dieser DNA wurde auf ein mit Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe) versetztes 1,5 %iges Agarose-Gel (s. Tabelle 6) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 3 Stunden bei einer Spannung von 80 V in Tris-Acid-EDTA-(TAE-) Puffer. Die DNA-Fragmente wurden auf einem UV-Transluminator (Biometra, Göttingen) bei Licht der Wellenlänge 254 nm sichtbar gemacht und photographiert.

**Tabelle 6: Lösungen für den DNA-Leiter**

1,5 % Agarosegel	3 g Agarose (Sigma, Deisenhofen) 120 ml 1x TAE-Puffer
1x TAE-Puffer	242 g Trisbase (Roth, Karlsruhe) 57,1 ml Eisessig (Merck, Darmstadt) 100 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0, Merck) ad 5 l RNase-freies A. dest. (Baxter, Unterschleißheim)

### **2.3.2 Terminale-Deoxynucleotidyl-Transferase-mediated dUTP Nick-End-Labeling (TUNEL-Assay)**

Im Gegensatz zum DNA-Strickleiter werden beim TUNEL-*Assay* die während der Apoptose entstehenden DNA-Strangbrüche direkt in der Zelle nachgewiesen. Dafür werden die DNA-Strangbrüche an ihrem freien 3'OH-Ende durch eine terminale Deoxynucleotidyltransferase mit Fluoreszenz-markiertem dUTP versehen.

Der TUNEL-*Assay* wurde mit dem *In situ cell Death Detection Kit* (Roche, Mannheim) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die erste Betrachtung der TUNEL-gefärbten Präparate erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop (DMRB, Leica, Wetzlar) bei 450 – 500 nm.

**Tabelle 7: Verwendete Lösungen**

4 % Formalin (Roth, Karlsruhe)
0,1 % Triton X (Boehringer, Mannheim),
0,1 % Sodiumcitrat (Sigma, München),
Phosphat gepuffertes Salin (PBS, PAA Laboratories, Linz, Österreich)

### 2.3.3 TUNEL-Assay und Gegenfärbung

Im TUNEL-Assay können apoptotische Zellen nachgewiesen. Um zu differenzieren, welche Zellart im Gewebe (Kardiomyozyten, Immunzellen etc.) Apoptose aufweist, wurde der TUNEL-Assay mit einer Gegenfärbung kombiniert (Doppelfärbung, *Double staining*). Dazu wurden die TUNEL-gefärbten Schnitte nach dem Färbeprotokoll mit einem Anti-Fluoreszenz-Antikörper und dem oben genannten APAAP-Komplex weiterbehandelt.

#### Färbeprotokoll der Gegenfärbung

- Anti-Fluoreszenz-Antikörper, mit Alkalischer-Phosphatase markiert
- Spülen mit Waschlösung
- Für 20 min Zugabe des APAAP-Komplexes (Dako, Hamburg)
- mit H<sub>2</sub>O spülen
- Gabe der Präparate in eine Neufuchsinhaltige Lösung (s. Tabelle 4) für 30 min
- Spülen mit H<sub>2</sub>O
- Gegenfärbung mit Hämalan<sup>®</sup> (Merck, Darmstadt) und Bläuen

### 2.3.4 Auswertung TUNEL-Assay und Gegenfärbung

Für den TUNEL-Assay und die Doppelfärbung wurden je Gruppe (native Kontroll-Herzen, akute Abstoßung postoperativ Tag 1, 3, 6, Isotransplantate Tag 6) n=4 Tiere verwendet. Es wurden 10 Gesichtsfelder bei 400facher Vergrößerung ausgezählt und die Zahl der apoptotischen Zellen pro 10 Gesichtsfelder berechnet.



### 2.4 Protein-Analyse mittels SDS-*Page* und Western Blot

#### 2.4.1 Proteinisolierung und Bestimmung der Proteinkonzentration

Gewebeproben wurden mit Hilfe eines Pistells und eines Mörsers in flüssigem Stickstoff zerkleinert. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen mit 200 µl *White-Cell-Extraction-Puffer* (WCE-Puffer) supplementiert und mit Proteinaseinhibitoren (Aprotinin, Leupeptin, PMSF und DTT, s. Tabelle 8) versetzt. Nach mehrmaligen schütteln (Vortexer: Janke und Kunkel, Staufen) wurde die Probe 5 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 66 µl Triton X-1:10 (Boehringer, Mannheim) und eine erneute Inkubation auf Eis. Die vollständige Lyse der Zell- und Kernmembranen wurde mit Hilfe eines Ultraschallgerätes (Bandelin electronic, Berlin) erreicht. Anschließend wurden die Proben bei 14000 UpM und 4 °C für 20 min zentrifugiert (Eppendorf, Hamburg) und der Überstand (Proteinlösung) in eiskalte Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80 °C bis zur Analyse aufbewahrt.

Die Quantifizierung des Gesamtproteins erfolgte nach der modifizierten Methode von LOWRY [123] mittels eines kommerziellen Kits (BioRad, München), entsprechend den Herstellerangaben. Die Proben wurden als Doppelbestimmung in 96er Mikrotiterplatten (Greiner-bio-one, Frickenhausen) detektiert. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde eine Standardreihe aus Rinderalbumin (BioRad, München: 20 µg/ml) mitgeführt. Die photometrische Auswertung erfolgte in einem ELISA-Reader bei 405 nm (Spectra II, SLT-Labinstruments, Salzburg, Österreich).

**Tabelle 8: Lösungen für die Proteinisolierung**

Lysepuffer	1 ml WCE-Puffer 10 $\mu$ l 100 mM DTT (Dithiothreitol, Sigma-Aldrich, Steinheim) 5 $\mu$ l 0,225 $\mu$ M Leupeptin (Sigma-Aldrich) 1 $\mu$ l 5 $\mu$ M Aprotonin (Buchs, Schweiz) 5 $\mu$ l 0,25 M PMSF (phenyl-methan-sulfonsäure-fluorid, Sigma-Aldrich)
WCE-Puffer	0,2 ml 1 M Hepes pH 7,8 (Roth, Karlsruhe) 0,9 ml 5 M NaCl (Roth) 4 $\mu$ l 0,5 M EDTA (Merck, Darmstadt) 0,1 ml 1 M Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, Steinheim), 2,5 ml Glycerin (Merck, Darmstadt) ad 10 ml Aqua dest (Baxter)
Triton X 1: 10	Triton X 100 (Boehringer, Mannheim) 1:10 mit WCE-Puffer verdünnt

### 2.4.2 SDS-Page

Proteine wandern in einem elektrischen Feld, entsprechend ihrer molekularen Größe, mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Molekülmasse. Dieses Prinzip wird bei der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-Page) [124] ausgenutzt. An Hand eines Molekulargewichtsstandards, ein Gemisch aus Proteinen mit charakteristischer Größe, kann das spezifische molekulare Gewicht nach Gellauf bestimmt werden.

In unseren Versuchen wurde als Trägermaterial ein Polyacrylamidgel verwendet (AAG, Rotiphorese<sup>®</sup>, Roth, Karlsruhe). Das Gel bestand aus zwei Phasen, die sich in Porengröße und pH-Wert unterschieden. Die Porengröße wurde von der

## Material und Methode

Konzentration des Gels an Acrylamid bestimmt. Die erste Phase, das Sammelgel mit größeren Poren, führte zur Anreicherung des Probenmaterials, die zweite Phase, das Trenngel, durch seine Porenbeschaffung zur eigentlichen Auftrennung der Proteine. Ein Zusatz an negativ geladenem Natriumdodecylsulfat (SDS, sodium dodecyl sulphat, Roth, Karlsruhe) in Gel und Puffer führte zur Entfaltung der Proteine (Aufhebung der Tertiär- und Sekundärstruktur).

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde für Proteine mit geringerer Molekülgröße ein 14 %iges Trenngel, für Größere ein 10 %iges Gel (s. Tabelle 9) verwendet. Zunächst wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit A. dest überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach 20 min. wurde das Wasser entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel geschichtet und ein Kamm zur Bildung von Geltaschen eingefügt. Dieser wurde nach Auspolymerisation des Gels entfernt. Die Polymerisierung der Acrylamidlösungen wurde durch Zugabe von TEMED<sup>®</sup> (Roth, Karlsruhe) und APS (Ammoniumperoxodisulfat, Roth, Karlsruhe) erreicht. Anschließend wurde das Gel in eine mit Elektrophoresepuffer (Laufpuffer, s. Tabelle 9) gefüllte Gelelektrophoresekammer eingesetzt. Als Gelelektrophoresekammern wurden Kammern von Firma Keutz (Reiskirchen) und BioRad (München) benutzt.

10 µg Proteinextrakt wurden mit Western-Blot-Auftragspuffer (s. Tabelle 9) im Verhältnis 1:1 gemischt und 5 min. bei 95 °C erhitzt (Trio-Thermoblock, Biometra, Göttingen). DTT (Dithiothreitol, Sigma-Aldrich, Steinheim) verhindert die Zusammenlagerung einzelner Proteine. Anschließend wurden die Proben bei 14.000 UpM kurz anzentrifugiert und in die Taschen des Gels eingebracht. Als Molekulargewichtsstandard wurde der Rainbowmarker (Amersham, Braunschweig) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte 18 h bei 27 V oder 1 h 45 min bei 100 V (Spannungsgerät Biometra oder BioRad).

## Material und Methode

**Tabelle 9: Lösungen für die Polyacrylamidgelelektrophorese**

Trenngel 10 %, 14 %	10 ml oder 14 ml AAG (Roth, Karlsruhe) 11,2 ml 1 M Tris (pH 8,8, Roth) 300 µl 10 % SDS (Roth) 8,7 ml A. dest. (Baxter) 24 µl Temed <sup>®</sup> (Roth) 300 µl 10 % APS (Roth, Karlsruhe)
Sammelgel 5 %	1,67 ml AAG (Roth, Karlsruhe) 1,25 ml 1 M Tris (pH 6,8, Roth) 100 µl 10 % SDS (Roth) 8,7 ml A.dest (Baxter, Unterschleißheim) 15 µl Temed <sup>®</sup> (Roth) 50 µl 10 % APS (Roth)
Ladepuffer	20 ml 1 M Tris (Roth, Karlsruhe) 80 ml 10 % SDS (Roth) 0,4 g Bromphenolblau (Sigma-Aldrich, Steinheim) 40 ml Glycerin (Roth) 60 ml Aqua dest (Baxter, Unterschleißheim)
Western-Blot- Auftragspuffer	400 µl Ladepuffer 100 µl 100 mM DDT (Sigma-Aldrich)
5x Laufpuffer	30,2 g 25 mM Tris (Roth, Karlsruhe) 188 g 192 mM Glycin (Roth) 100 ml SDS 10 % (Roth) ad 2000 ml Aqua dest (Baxter, Unterschleißheim)

### 2.4.3 Western Blot

Beim Western Blotting werden die elektrophoretisch getrennten Proteine aus dem Gel auf die Oberfläche einer Nitrocellulosemembran transferiert [125]. Der Transfer der Proteine wird durch unterstützende Diffusion auf einen sekundären Träger erreicht (Western Blot).

Der Transfer wurde nach dem Verfahren des *Semidryblottings* im „Sandwich-Aufbau“ durchgeführt. Bei diesem Verfahren liegen Membran und Gel zwischen zwei Platten (Graphit oder Platin überzogenes Titan), eingebettet in mit Puffer durchdrängtem Filterpapier. Zwischen den Platten wird das elektrische Feld aufgebaut, das die Diffusion der Proteine von Gel zu Membran bewirkt. Hydrophobe Wechselwirkungen sorgen für die Bindung der Proteine auf der Membran und deren Immobilisierung.

Die PVDF-Membran (polyvinylidene difluoride, Immun Blot™ PVDF-Membran 0,2 µm, BioRad, München) wurde zunächst für 20 sek. in Methanol (Sigma-Aldrich, Seelze) gelegt, um die Bindung der Proteine auf die Membran zu erhöhen. Danach wurden Gel und Membran getrennt für 15 min in Western-Blot-Transferpuffer (s. Tabelle 10) inkubiert und zusätzlich 6 auf Gelgröße zugeschnittene Whatman® Papierbögen (Schleicher und Schuell, Dassel) mit Transferpuffer getränkt. Anschließend wurde alles in die Transferzelle des *Semidry-Blot*-Gerätes (Keutz, Reiskirchen oder BioRad, München) gelegt. Die Transferzeit der Proteine dauerte für große Gele 1 h bei 400 mA oder 20 min bei 200 mA für kleine Gele.

**Tabelle 10: Lösungen für das Blotting**

Transferpuffer	3,02 g 25 mM Tris (Roth, Karlsruhe) 14,4 g 192 mM Glycin (Roth) 200 ml Methanol (Sigma-Aldrich, Seelze) 10 ml 10 % SDS (Roth) ad 1000 ml Aqua dest (Baxter, Unterschleißheim)
----------------	---

### 2.4.4 Immunfärbung der Blot-Membran

Mit Hilfe einer Antikörper-gekoppelten Farbreaktion wurden spezifische Proteine gefärbt. Um eine spezifische Erkennung der Proteine durch den Primärantikörper zu ermöglichen, muss zuvor ein Blockschritt durchgeführt werden (s. unten). Der eigentliche Nachweis erfolgt durch einen zweiten Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase (HR-Peroxidase) markiert ist. Die Zugabe von Luminol löst in der „*Enhanced-Chemiluminescence-Reaction*“ (ECL-Reaktion) eine Chemilumineszenz aus, die über einen lichtsensitiven Film detektiert wird. Die Schwärzung des Films ist dabei proportional zur Menge an Protein.

Nach dem Blotten wurde die PVDF-Membran (Immun Blot PVDF-Membran 0,2  $\mu\text{m}$ , BioRad, München) zum Blockieren unspezifischer Banden für mindestens 1 h in Blockungspuffer (5 %-Magermilch, s. Tabelle 11) inkubiert. Das Blockieren erfolgte bei Raumtemperatur und, zur gleichmäßigen Verteilung der Lösung, bei 14 UpM auf einem Schüttler (Polymax 2040, Heidolph, Deutschland). Anschließend wurde der in Blockungspuffer verdünnte Primärantikörper (s. Tabelle 12) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden am nächsten Tag dreimal mit Waschpuffer gewaschen und die Membran für 1 h mit dem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper (s. Tabelle 13) bei 14 UpM für 1 h inkubiert. Daraufhin folgte der genannte Waschvorgang erneut. Im letzten Schritt erfolgte die Zugabe der Chemilumineszenz (ECL-Kit,

## Material und Methode

Amersham, Braunschweig) entsprechend der Herstellerangabe. Nach 5 min Inkubation mit ECL plus bei Raumtemperatur wurde die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen und ein Röntgenfilm aufgelegt. Der belichtete Röntgenfilm wurde in der diagnostischen Radiologie bei Prof. Dr. med. RAU entwickelt. Die Bandenstärke konnte mit Hilfe des Software-Programms Scanpack 3.0 (Biometra) ausgewertet werden.

### **2.4.5 „Strippen“ von Blotmembranen und Immunfärbung mit Aktin**

Zum Ausschluß von Ladungsungleichheit der Proben an Gesamtprotein wurde die Membran gestrippt und anschließend mit Aktin (s. Tabelle 12) inkubiert. Aktin ist ein Strukturprotein (internes Standardprotein), das in seiner Konzentration in den verschiedenen Versuchsgruppen (native Kontroll-Herzen, Tag 1, 3, 6) annähernd gleich ist. Durch Anwendung einer Glycin-HCL-Lösung (s. Tabelle 11) konnte die Membran zur erneuten Immunfärbung verwendet werden.

Zunächst wurde die ECL plus Lösung mit Hilfe von Waschlösung entfernt und anschließend die Membran für eine Stunde in der Glycin-HCL-Lösung bei niedriger Umdrehung inkubiert. Nach einem kurzen Waschvorgang erfolgte für 1 h die Zugabe des Blockungspuffers (5 %-Magermilch, s. Tabelle 11). Über Nacht inkubierte die Membran dann in einer Anti-Aktin-Magermilchlösung. Es erfolgte die Markierung der Banden mit einem Zweitantikörper und anschließend die Visualisierung der spezifisch gebundenen Antikörperkomplexe mit Hilfe von ECL plus.

## Material und Methode

**Tabelle 11: Lösungen für das Markieren der Blot-Membran und das Strippen**

5 % Magermilch	10 g Magermilchpulver ( <i>Skim milk powder</i> , Fluka) 200 ml Waschpuffer
Waschpuffer	500 ml PBS 10x (Invitrogen, Paisley, Scotland) 5 ml TWEN 20 (Polyoxyethylene-Sorbitant-Monolaurate, Sigma-Aldrich, Steinheim) ad 5 l A. dest. (Baxter)
Glycin-HCL-Lsg.	5 ml 1 M Glycin (Roth, Karlsruhe) 45 ml Aqua dest (Baxter) 500 µl HCL (Sigma-Aldrich, Seelze)

**Tabelle 12: Primärantikörper zum Markieren der Blot-Membran**

Anti-Bax-	<i>Rabbit-anti-rat</i> , Santa Cruz (Santa Cruz, USA), Verdünnung 1: 2000, 21 kDa
Anti-Bcl 2	<i>Rabbit-anti-rat</i> , Santa Cruz, Verd. 1: 2000, 26 kDa
Anti-FasL	<i>Mouse-anti-rat</i> , Transduction Laboratories (Lexington, Kentucky), Verd. 1:1000, 37 kDa
Anti-Caspase 3	<i>Rabbit-anti-rat</i> , Cell signaling (New England Biolabs GmbH, Frankfurt), Verd. 1: 1000, 32 – 35 kDa
Anti-Cleaved-Caspase-3	<i>Rabbit-anti-rat</i> , Cell signaling, Verd. 1:1000, 17 + 19 kDa
Anti-Akt	<i>Rabbit-anti-rat</i> , Cell signaling, Verd. 1:1000, 60 kDa
Anti-NFκB	<i>Rabbit-anti-rat</i> , Cell-signaling, Verd. 1:1000, 65 kDa
Anti-IκB-α	<i>Rabbit-anti-rat</i> , Cell signaling, Verd. 1:1000, 41 kDa
Anti-Aktin	<i>Goat-anti-rat</i> , Santa Cruz, Verdünnung 1:1000, 43 kDa



**Tabelle 13: Zweitantikörper zum Markieren der Blot-Membran**

1. Zweitantikörper	<i>Goat-anti-rabbit</i> IgG-HRP, Santa Cruz, Verd. 1:4000
2. Zweitantikörper	<i>Sheep-anti-mouse</i> IgG-HRP, Amersham (Braunschweig), Verd. 1:2000
3. Zweitantikörper	<i>Rabbit-anti-goat</i> IgG-HRP, Santa Cruz, Verdünnung 1:2000

### 2.4.6 Auswertung

Die Auswertung des Western Blots erfolgte mittels densitometrischer Messung (ScanPac 3,0, Biometra). Zur Vergleichbarkeit der einzelnen Proben wurden diese ins Verhältnis zu Actin gesetzt.

Zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten nach Transplantation (Tag 1, 3 und 6 Tiere) wurden jeweils vier Herzen untersucht. Von jedem Herzen wurden 2-5 Western Blot-Analysen durchgeführt. Die daraus resultierenden Daten wurden mit denen nicht transplantierte Herzen verglichen.

## 2.5 Semiquantitative RT-PCR

### 2.5.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Extraktion erfolgte nach der Methode von CHOMCZYNSKI und SACCHI [126] mit dem Roti-Quick-Kit (Roth, Karlsruhe) nach den Angaben des Herstellers. Die so gewonnene RNA wurde bei -80 °C gelagert.

Für die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die optische Dichte (O.D.) der zu messenden RNA bei 260 nm und 280 nm photometrisch (Biophotometer,

## Material und Methode

Eppendorf, Hamburg) gemessen. Die O.D. 260 nm gibt den Nukleinsäure-Gehalt der Lösung an, während die O.D. 280 nm den Proteingehalt ermittelt. Der Quotient zwischen beiden optischen Dichten ist somit ein Maß für die Reinheit der RNA-Isolierung. Dieser sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Aus der O.D. 260 nm einer Lösung wurde die Konzentration an RNA wie folgt bestimmt:  $O.D. 260 \text{ nm} \times 40 = \text{RNA Konzentration in } \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

### 2.5.2 Reverse Transkription

Um RNA mittels PCR quantifizieren zu können, muss diese zunächst über eine Reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dabei macht man sich die Eigenschaften eines retroviralen Enzyms, der Reversen Transkriptase, zunutze, welche aus einer RNA-Matrize eine komplementäre DNA synthetisiert.

Zunächst wurde ein Mastermix (s. Tabelle 14) erstellt.

**Tabelle 14: RT-Mastermix für die Reverse Transkription**

RT-Mastermix	3 $\mu\text{l}$ 15 nM Random Primer (Boehringer Mannheim) 10 $\mu\text{l}$ 15 nmol randomisierte Hexanukleotide (Gibco BRL, Eggenstein) 2 $\mu\text{l}$ dNTP's (Perkin Elmer, Norwalk) 5 $\mu\text{l}$ 10 mM DTT (Dithiothreitol) (Gibco BRL) 1 $\mu\text{l}$ 20 U RNAsin (Promega, Mannheim) 2 $\mu\text{l}$ 100 U Reverse Transkriptase ( <i>moloney murin leukemia virus reverse transcriptase</i> ) (Gibco BRL)
dNTP's	Je 1 mM von dATP, dCTP, dGTP und dTTP

1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  RNA-Lösung wurde mit 23  $\mu\text{l}$  Mastermix verschmischt. Die Synthese der komplementären DNA erfolgte in einem Thermozykler (Promega, Mannheim) während einer 60 minütigen Inkubation bei 37 °C. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte bei 94 °C für 7 min. Bis zur weiteren Analyse wurde die cDNA bei -24 °C aufbewahrt.

### 2.5.3 PCR

Die PCR-Technik ist eine in mehreren Zyklen ablaufende in-vitro-Technik zur gezielten Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte. Hierfür werden speziell angefertigte Oligonukleotidprimer eingesetzt, die die DNA-Zielsequenz flankieren und der thermostabilen Taq-Polymerase als Startsignale dienen. Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Temperaturschritten, die repetitiv durchlaufen. Neben der Bcl-2-cDNA wurde die cDNA des zellspezifischen Housekeeping-Gens PBGD (Porphobilinogen deaminase) vervielfacht. In der Auswertung erfolgte dann der Bezug der Ziel-RNA-Expression (Bcl-2) auf die von der Zelle weitgehend konstant synthetisierte RNA-Sequenz (PBGD) durch Ermittlung eines Quotienten.

Zur Polymerase-Kettenreaktion der synthetisierten cDNA wurden 2 µl cDNA mit 23 µl PCR-Mastermix (s. Tabelle 15) gemischt. Dabei wurde ein Mastermix für den internen Standard (*Housekeeping-Gen*) PBGD (Porphobilinogen deaminase) und ein für den Bcl-2-Primer verwendet. Die Sequenzen der Primer finden sich in Tabelle 16. Die Proben wurden in einem Thermozykler (Promega, Mannheim) für die Dauer der in Tabelle 17 angegebenen Temperaturen inkubiert.

**Tabelle 15: PCR-Mastermix**

PCR-Mastermix für PBGD	19 µl RNase-freies Aqua dest 2,5 µl Transkriptionspuffer (Perkin Elmer, Norwalk) 2,5 µl dNTP's (Perkin Elmer) 1 µl 1 µM antisense Primer (Metabion) 1 µl 1 µM sense Primer (Metabion) 0,15 µl 0,75 U AmpliTaq DNA Polymerase (Perkin Elmer)
PCR-Mastermix für Bcl-2	16 µl RNase-freies A.dest 2,5 µl Transkriptionspuffer (Perkin Elmer, Norwalk) 2,5 µl dNTP's (Perkin Elmer) 2,5 µl 1 µM antisense Primer (Metabion) 2,5 µl 1 µM sense Primer (Metabion) 0,15 µl 0,75 U AmpliTaq DNA Polymerase (Perkin Elmer)

**Tabelle 16: Primersequenzen und Produktgröße**

PBGD	Sense 5`-CAA GGT TTT CAG CAT CGC TAC CA-3` Antisense 5`-ATG TCC GGT AAC GGC GGC-3`	135 bp	Ref. [127]
Bcl-2	Sense 5`-CTG TAC GGC CCC AGC ATG CG-3` Antisense 5`-GCT TTG TTT CAT GGT ACA TC-3`	231 bp	Ref. [128]

**Tabelle 17: Thermozyklerbedingungen**

PBGD	95 °C für 6 min, 35 Zyklen [95 °C für 20 sek., Annealing 59 °C für 30 sek., Extension 73 °C für 30 sek.] 73°C für 7 min
Bcl-2	95 °C für 4 min, 30 Zyklen [95 °C für 45 sek., Annealing 55 °C für 1 min, Extension 72 °C für 1 min] 72 °C für 4 min

#### 2.5.4 Gel-Elektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten Nukleinsäure-Fragmente erfolgte in TAE-Puffer bei 100 V für 1,5 Stunden. Zunächst wurde ein 2,5 %iges Agarosegel (s. Tabelle 18) gegossen und nach Abkühlen auf etwa 50 °C mit 4 µl Ethidiumbromid versetzt. Anschließend wurde die Lösung in eine Flachbett-Gelkammer gegossen und zur Bildung von Geltaschen ein Kamm eingefügt. Nach Auspolymerisation wurde das Gel mit TAE-Puffer überschichtet, der Kamm entfernt und die mit Probenpuffer (*gel loading solution*, Sigma-Aldrich, Steinheim) im Verhältnis 1:1 gemischte DNA in die Taschen des Geles eingebracht. Für die Größenbestimmung der DNA-Banden wurde ein DNA-Marker (Hinf 1-Marker, Promega) in einer Konzentration von 1 mg/ml mitgeführt.

**Tabelle 18: Lösungen für die Gelelektrophorese nach PCR**

4 % Agarosegel	1,25 g Agarose Gel (Sigma-Aldrich, Steinheim), 50 ml 1x TAE-Puffer
1x TAE-Puffer	242 g Trisbase (Roth, Karlsruhe) 57,1 ml Eisessig (Merck, Darmstadt) 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0, Merck) ad 5 l RNase-freies A.dest. (Baxter, Unterschleißheim)

### 2.5.5 mRNA-Auswertung

Zur Visualisierung der Banden wurde das Gel UV-Licht exponiert, in einer Geldokumentationsanlage abgebildet, ab fotografiert und zur weiteren quantitativen Auswertung gespeichert. Die quantitative Auswertung erfolgte densitometrisch unter Verwendung eines Geldokumentationssystems (Scan Pac/Biometra).

## 2.6 Statistische Auswertung

In dieser experimentellen Arbeit wurden 5 verschiedene Gruppen miteinander verglichen (native Kontroll-Herzen, Tag 1, 3, 6 nach Transplantation, Isotransplantate Tag 6, je nach Fragestellung). Jede Gruppe dieser Untersuchung enthielt n=4 Tiere. Jeder Versuch wurde mehrfach wiederholt und daraus der Mittelwert gebildet.

Die statistische Erhebung erfolgte unter Zuhilfenahme des Statistikprogrammes StatsDirect<sup>®</sup> Version 1.9.8 für MS Windows<sup>®</sup>. Die Angaben der Daten erfolgte als Mittelwert (MW) und Standardfehler der Mittelwerte (SEM), bzw. Standardabweichung (SD).

## Material und Methode

Zur Berechnung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen wurde ein Rangsummentest, der Kruskal-Wallis-Test, angewendet. Werte von  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant betrachtet und als \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  angegeben.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Transplantatabstoßung

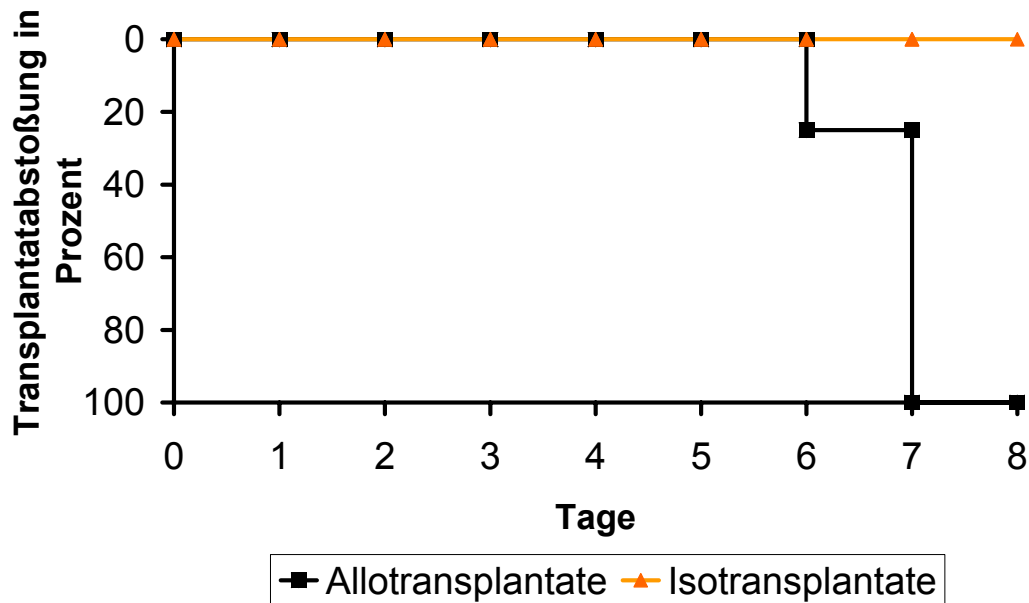
Zur Untersuchung der Apoptose als Effektormechanismus der akuten Transplantatabstoßung wurde das Wistar-Furth zu Lewis, vollständig allogene Transplantationsmodell verwendet. In einem „*Non-working-heart*“-Modell wurden die Herzen männlicher WF-Inzuchtratten an die großen Bauchgefäße von männlichen LEW-Inzuchtratten angeschlossen. Dieses heterotope Herztransplantationsmodell ist seit den 70er Jahre das Standardmodell für Untersuchungen der immunologischen Komponenten bei akuter und chronischer Abstoßung [121].

In dieser Arbeit wurde zunächst palpatorisch in einem in-vivo Versuch der Abstoßungszeitpunkt der Transplantate bestimmt. Im nächsten Schritt wurden die Transplantate für die in-vitro Versuche zu definierten Zeitpunkten entnommen, um die Frühphase (Tag 1), Intermediärphase (Tag 3) und Spätphase (Tag 6) der Abstoßung zu erhalten. Die Präparate wurden histologisch aufbereitet und nach Zeichen der akuten Abstoßung hin untersucht.

##### 3.1.1 Kinetik der Transplantatabstoßung

Ohne immunsuppressive Therapie wurden die Transplantate innerhalb von 7 Tagen abgestoßen. Mittels Palpationsscore wurde die Organfunktion der transplantierten Herzen untersucht (Tabelle 2) und eine Überlebenskurve erstellt (Abbildung 8). Es zeigte sich, dass die transplantierten Organe 7 Tage nach Transplantation keine zu erkennende Funktion mehr aufwiesen.

## Ergebnisse



**Abbildung 8: Transplantatabstoßung in Prozent**

die Abbildung zeigt die Transplantatabstoßung in Prozent. An Tag 7 zeigten alle allogenen Transplantate keine Aktivität mehr. Die Isotransplantate überlebten unendlich (n=4/Gruppe).

Zur systematischen Analyse der intrazellulären Ereignisse während der akuten Abstoßung erfolgte die Explantation nach einem, drei oder sechs Tagen. Die verschiedenen Tage der Organentnahme sollen verschiedene Ebenen der Abstoßung kennzeichnen, Tag 1: Entnahme während der Frühphase der Abstoßung, Tag 3: Amplifikationsphase, Beginn der Effektorphase und Tag 6: Effektorphase. Als Vergleichsgewebe dienten nicht transplantierte WF-Herzen (native Herzen).

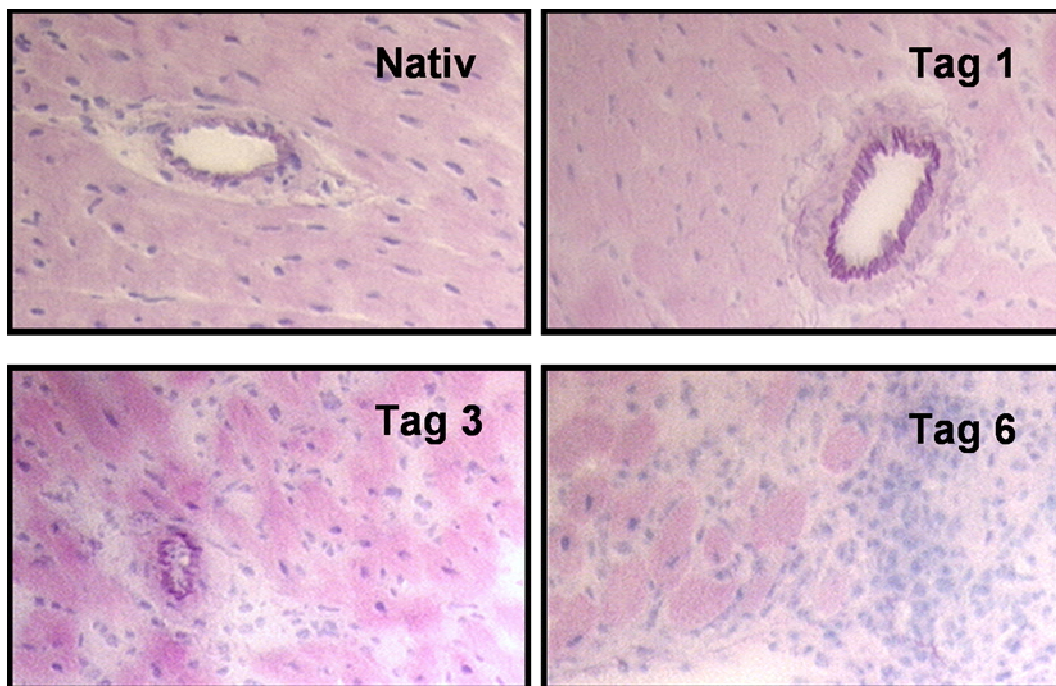
### 3.1.2 Histologischer Nachweis der Transplantatabstoßung

Ein Charakteristikum der akuten Abstoßung ist die progressive Infiltration des Transplantatgewebes durch mononukleäre Zellen [11, 25]. Die Elastika-Hämatoxylin-Eosin-Färbung diente zur Erfassung dieser Infiltration in die Transplantate.



## Ergebnisse

Bei Analyse der gefärbten Schnitte (s. Abbildung 9) zeigte sich im Verlauf der akuten Abstoßung eine Zunahme an infiltrierenden, mononukleären Zellen. Bereits an Tag 1 ließ sich eine Perivaskulitis (Begleitentzündung um die Gefäße) und eine ödematöse Auflockerung des Myozytenverbandes feststellen. In der Folge der Tage nahmen die Perivaskulitis und das Gewebsödem noch weiter zu. Tag 6-Gewebe zeichnete sich zusätzlich durch stellenweise Fibrosierung und Kardiomyozytenschädigung aus. Zur Quantifizierung der gewebsinfiltrierenden Zellen wurden immunhistochemische Färbungen verwendet. T-Lymphozyten und Makrophagen spielen bei der zellulären Immunität eine entscheidende Rolle. Es konnte ein hochsignifikanter Anstieg beider Zellgruppen im Laufe der Abstoßung festgestellt werden [11].



**Abbildung 9: Elastika-Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Zu sehen sind 4 repräsentative Bilder der jeweiligen Gruppe (Nativ, Tag 1, Tag 3 und Tag 6 nach Transplantation; Vergrößerung 400fach). Die zelluläre Infiltration nahm im Verlauf der akuten Abstoßung zu. Die Veränderung in den allogenen Präparaten begann an Tag 1 nach Transplantation mit einer Perivaskulitis. An Tag 3 stieg die Zahl der mononukleären Zellen im Gewebe. Es kam zu einer zunehmenden Auflösung des Myozytenverbandes. An Tag 6 war die Gewebestruktur stellenweise vollständig zerstört und von inflammatorischen Zellen durchsetzt.

### 3.2 Apoptosenachweis

Apoptose ist ein energieabhängiger Prozess, der sich dadurch auszeichnet, dass die Zelle-genetisch programmiert-zu einer vorbestimmten Zeit stirbt. Der Vorgang verläuft in Stufen, und ist deshalb möglicherweise beeinfluss- oder umkehrbar [38, 40]. Apoptose wird durch folgende morphologische Kriterien charakterisiert: Chromatinkondensation, DNA-Fragmentation, Bildung von apoptotischen Körperchen und Zelllyse [44-47].

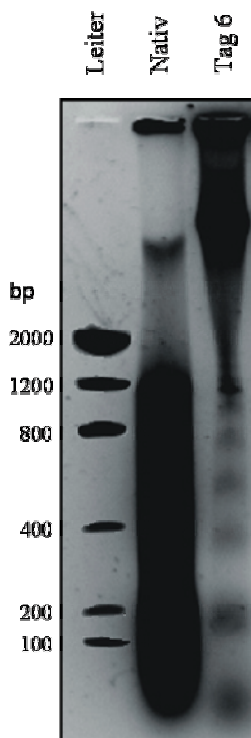
Zum Nachweis der DNA-Fragmentierung dienen zwei Verfahren: das DNA-Laddering, ein qualitatives Verfahren, und der TUNEL-Assay. Mit Hilfe des TUNEL-Assay konnte eine Quantifizierung der apoptotischen Zellen erfolgen und anschließend mit einer Gegenfärbung bestimmt werden, welcher Art die apoptotischen Zellen waren.

#### 3.2.1 DNA-Laddering

Ein Charakteristikum von Apoptose ist die Auftrennung der DNA in Fragmente [42]. Diese kann im Agarosegel als spezifischer Leiter dargestellt werden. Nichtfragmentierte DNA erscheint dagegen als durchgängiger „Schmier“.

In den nativen Kontroll-Herzen konnten keine DNA-Spaltprodukte (s. Abbildung 10) nachgewiesen werden. Tag 6 Transplantate wiesen dagegen das für die Apoptose entscheidende Bild auf, d. h. die Spaltung der DNA in Oligonukleosomen von 180 – 200 bp Länge.

## Ergebnisse



**Abbildung 10: DNA-Laddering**

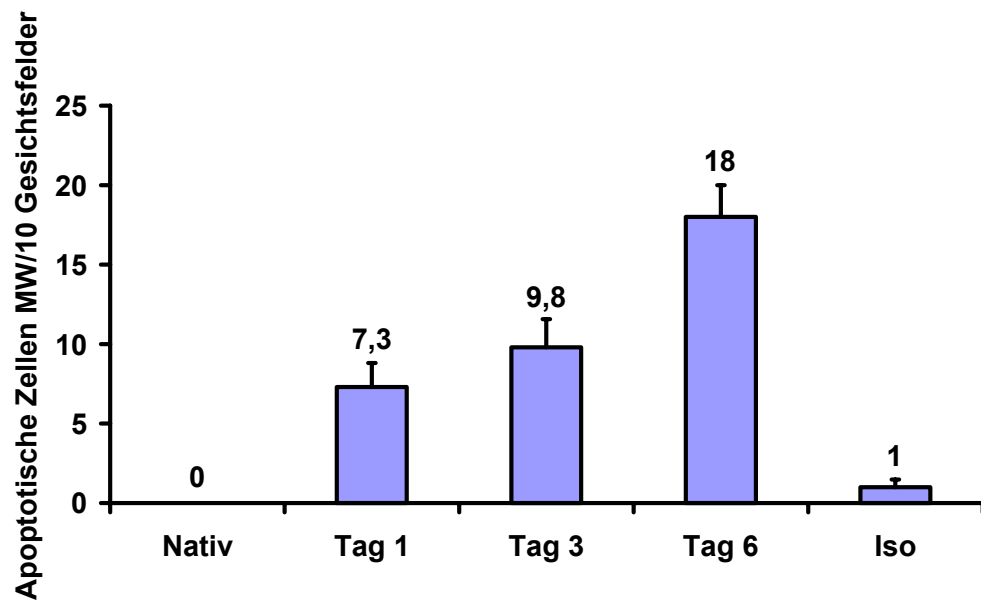
Der DNA-Laddering-Nachweis zur Bestimmung der DNA-Fragmentierung zeigte an Tag 6 die charakteristische Auftrennung der DNA in mehrere Banden, bei den nativen Tieren ließen sich die Banden nicht voneinander trennen (n= 4/Tag).

### 3.2.2 TUNEL-Assay und Gegenfärbung

Eine weitere Methode zur Erfassung der DNA-Spaltprodukte ist der TUNEL-Assay. Die Fragmente wurden mit Fluoreszien markiert und die fluoreszierenden Zellen konnten anschließend ausgezählt werden. Als Vergleichsgewebe dienten native Organe und Tag 6 Isotransplantate. Bei den Isotransplantaten handelte es sich um Transplantate, bei denen Spender und Empfänger aus demselben Ratteninzuchtstamm entstammten. Sie dienten zur Kontrolle, ob Ischämie und Reperfusion an Tag 6 für die Auslösung der akuten Abstoßung eine Rolle spielte.

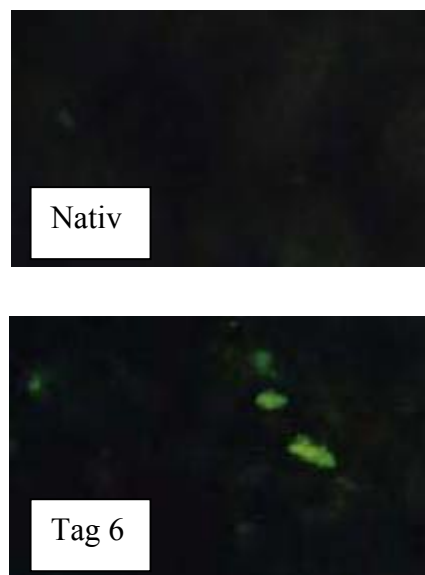
Im Vergleich zu Nativen Kontroll-Herzen und den Tag 6 Isotransplantaten konnte eine Zunahme an apoptotischen Zellen an den Tagen 1, 3 und 6 nachgewiesen werden (s. Abbildung 11).

## Ergebnisse



**Abbildung 11: Nachweis von apoptotischen Zellen mittels TUNEL-Assay**

Dargestellt ist die Anzahl an apoptotischen Zellen pro 10 Gesichtsfelder (n=4/Gruppe; Vergrößerung: 400fach)

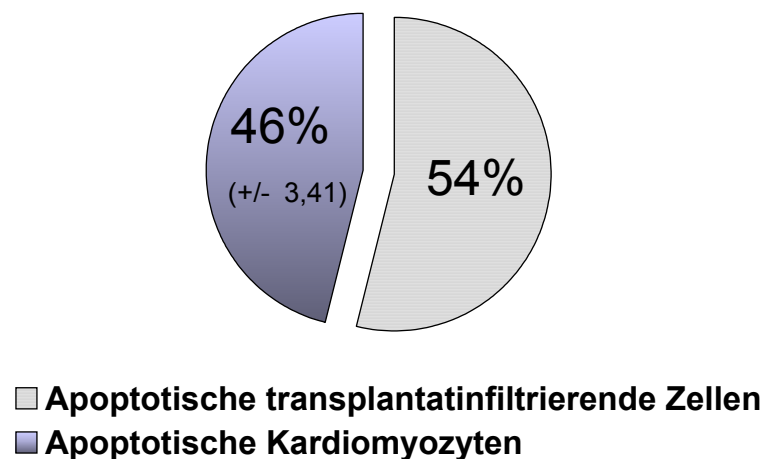


**Abbildung 12: TUNEL-Assay**

Zu sehen sind 2 repräsentative Bilder der Gruppe nativer Kontroll-Herzen und Tag 6-Herzen nach Transplantation.

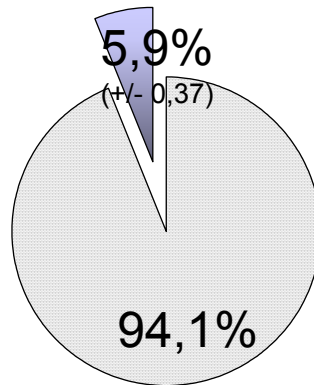
## Ergebnisse

Zur Differenzierung welche Zellen (Kardiomyozyten, Immunzellen) apoptotisch waren, wurde im Anschluß an den TUNEL-*Assay* eine zweite Färbung (Doppelfärbung, mit Hilfe von Fluoreszenzantikörpern und der APAAP-Methode) durchgeführt. Mit einem Anteil von fast 50 % erwiesen sich die apoptotischen Zellen als Kardiomyozyten (s. Abbildung 13), der Rest waren transplantatinfiltrierende Zellen. Des Weiteren konnten 6 % aller Herzmuskelzellen am Tag 6 nach Transplantation im Zustand der Apoptose gesehen werden (s. Abbildung 14).



**Abbildung 13: Prozentualer Anteil der apoptotischen Kardiomyozyten an der Gesamtzahl der apoptotischen Zellen**

am Tag 6 nach Transplantation, nachgewiesen über TUNEL-*Assay* und Gegenfärbung (MW + SD)



□ Kardiomyozyten ■ Apoptotische Kardiomyozyten

**Abbildung 14: Prozentualer Anteil der apoptotischen Kardiomyozyten an der Gesamtzahl der Kardiomyozyten**

am Tag 6 nach Transplantation, nachgewiesen über TUNEL-Assay und Gegenfärbung (MW + SD)

### 3.3 Apoptoseregulation

Apoptose zeichnet sich durch eine starke Regulation durch Proteasen und Nukleasen aus [37]. Verschiedene Signaltransduktionswege induzieren den programmierten Zelltod [61, 66]. Zum Nachweis, welche Regulatoren während der akuten Transplantatabstoßung in diesem Modell relevant sind, wurden folgende entscheidende Proteine untersucht:

- NFκB und IκB: Der Transkriptionsfaktor NFκB und sein Inhibitor IκB sind im Zytoplasma aneinander gebunden. Trennt sich NFκB von IκB, kann NFκB im Nukleus die Transkription von bestimmten Genen fördern, die wichtig für Apoptose und Inflammation sind (s. Abbildung 7).

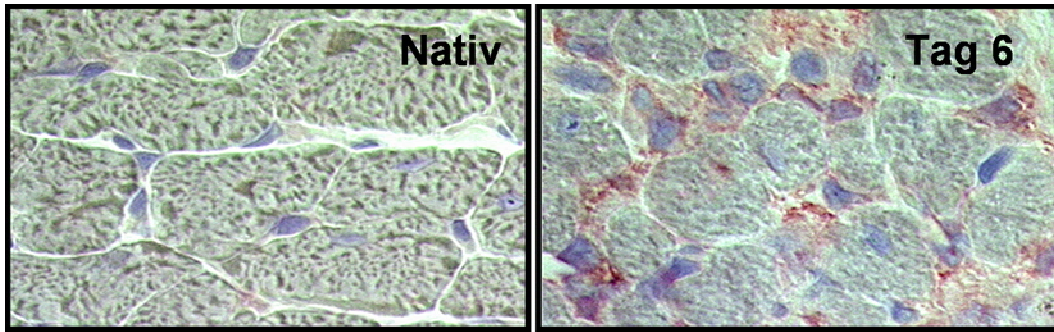
## Ergebnisse

- iNOS gehört zu den Genen, deren Expression von NFκB reguliert werden. Wird iNOS vermehrt im Cytoplasma gebildet, ist es in der Lage, Stickstoffoxid (NO) zu synthetisieren und somit Apoptose auszulösen.
- Bax nimmt als proapoptisches, cytoplasmatisches Protein der Bcl-2-Familie an der Induktion von Apoptose durch Freisetzung mitochondrialer Faktoren teil, die zur Aktivierung von Caspase 3 führt (s. Abbildung 4).
- Bcl-2 ist ein Gegenspieler von Bax, es ist beteiligt an der Apoptose-Hemmung. Das Gleichgewicht zwischen Bax und Bcl-2 ist wichtig für die Zellhämöostase (s. Abbildung 3).
- Caspase 3 ist hauptsächlich für die Auslösung der morphologischen Veränderungen in einer apoptotischen Zelle verantwortlich. Ihre Substrate führen z. B. zur Chromatinkondensierung, DNA-Fragmentierung und zum Kernzerfall.
- FasL kann als Transmembranprotein durch Bindung an seinen Rezeptor Fas in bestimmten Zellen eine intrazelluläre Kaskade auslösen, die den programmierten Tod der Zelle verursacht (s. Abbildung 5).
- Akt wird intrazellulär über verschiedene Mechanismen eine zellschützende Funktion nachgesagt (s. Abbildung 6).

### 3.3.1 iNOS

Mit Hilfe der Immunhistochemie konnten iNOS-positive Zellen am Tag 1, 3 und 6 nach Transplantation und in nativen Kontroll-Herzen bestimmt werden.

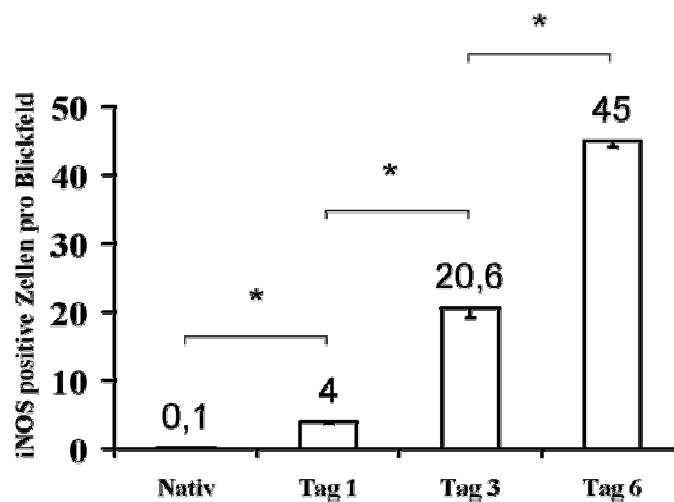
## Ergebnisse



**Abbildung 15: iNOS-Färbung**

Zu sehen sind 2 repräsentative Bilder der Gruppe nativer Kontroll-Herzen und Tag 6-Herzen nach Transplantation. Native Kontroll-Herzen wiesen fast keine iNOS-positiven Zellen auf, am Tag 6 ließ sich eine deutliche Zunahme an positiven Zellen feststellen (Vergrößerung: 400fach).

Native Kontroll-Herzen wiesen fast keine iNOS-positiven Zellen pro Blickfeld auf. Allogene Transplantate zeigten bereits am Tag 1 nach Transplantation eine vermehrte Proteinexpression, am Tag 3 betrug die Zahl der iNOS-positiven Zellen ca. 21 ( $\pm 1,5$ ) pro Blickfeld und am Tag 6 45 ( $\pm 0,9$ ).



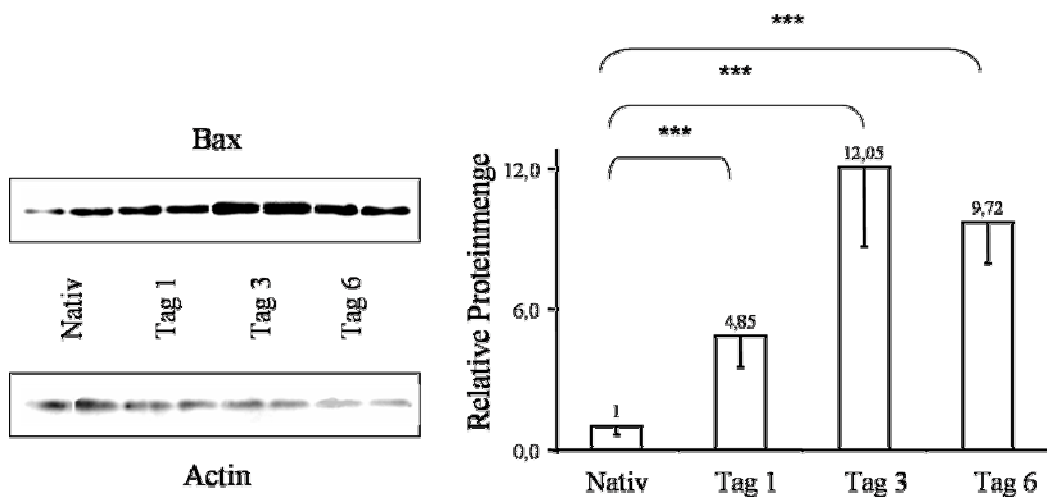
**Abbildung 16: iNOS-Graphik**

Dargestellt ist die Anzahl an iNOS positiven Zellen im Mittelwert pro Gesichtsfeld. MW +SEM (n=4/Gruppe; Vergrößerung: 400fach), \*  $p < 0.05$



### 3.3.2 Bax und Bcl-2

Mit Hilfe des Western Blots konnte die relative Proteinmenge von Bax an Tag 1, 3 und 6 nach Transplantation im Vergleich zu nativen Kontrollherzen bestimmt werden. Bereits am Tag 1 zeigte sich ein signifikanter Anstieg von Bax um das ca. 5 fache des Ausgangswertes mit einer weiteren Zunahme am Tag 3 und 6 um das 10-12 fache. Dagegen bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Tag 3- und Tag 6-Transplantaten.



**Abbildung 17: Bax**

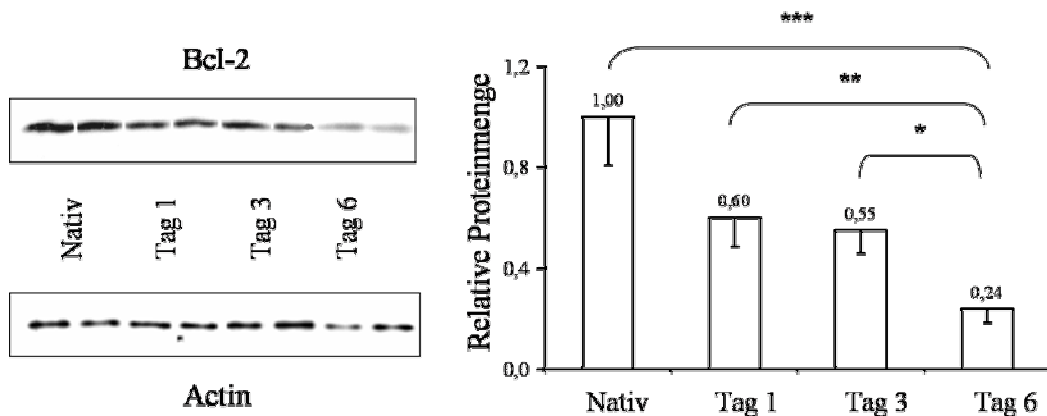
Links: Western Blot von Bax und Actin (internes Standardprotein). Exemplarisch werden 2 Proben je Untersuchungsgruppe in einem repräsentativen Gel gezeigt.

Rechts: Densitometrische Auswertung des Western Blots. Relative Proteinmenge von Bax an den Tagen 1, 3 und 6 nach Transplantation bezogen auf native Kontroll-Herzen.

MW  $\pm$  SEM (n=4/Gruppe) \*\*\*p < 0,001

## Ergebnisse

Mit Hilfe des Western Blots konnte die relative Proteinmenge von Bcl-2 am Tag 1, 3 und 6 nach Transplantation im Vergleich zu nativen Kontroll-Herzen bestimmt werden. An Tag 6 erreichte die Reduktion von Bcl-2 ein Viertel des Ausgangswertes vor Transplantation. Dagegen bestand kein signifikanter Unterschied in der Frühphase der akuten Abstoßung zu nativen Kontrollherzen.



**Abbildung 18: Bcl-2**

Links: Western Blot von Bcl-2 und Actin (internes Standardprotein). Exemplarisch werden 2 Proben je Untersuchungsgruppe in einem repräsentativen Gel gezeigt.

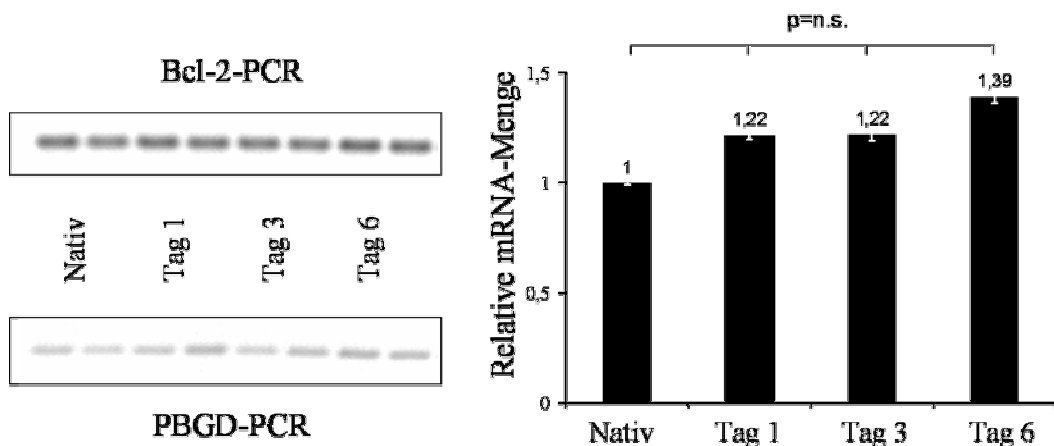
Rechts: Densitometrische Auswertung des Western Blots. Relative Proteinmenge von Bcl-2 an den Tagen 1, 3 und 6 nach Transplantation bezogen auf native Kontroll-Herzen. MW  $\pm$  SEM (n=4/Gruppe) \*p < 0.05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001.

Anschließend wurde das Verhältnis von Bcl-2 zu Bax berechnet. Den Berechnungen zufolge kam es zu einem Abfall des Quotienten Bcl-2/Bax von den nativen Kontrollherzen zu Tag 1 um das 8fache, zu Tag 3 um das 22fache und Tag 6 um das 41fache. Es zeigte sich somit bereits ab Tag 1 ein Überwiegen von Bax über Bcl-2. Obwohl Bax sein Maximum bereits an Tag 3 erreichte, nahm der Quotient Bcl-2/Bax bis zur Organabstoßung weiter ab.

### 3.3.3 Posttranskriptionelle Degradation von Bcl-2

Auf Proteinebene konnte eine Abnahme der Konzentration von Bcl-2 gefunden werden. Auf welchem Wege die Konzentrationsabnahme erfolgte, sollte im Weiteren untersucht werden (posttranskriptionelle Degradation versus transkriptionelle Regulation).

Mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR konnte die relative mRNA-Menge von Bcl-2 am Tag 1, 3 und 6 nach Transplantation im Vergleich zu nativen Kontroll- Herzen bestimmt werden. Es zeigte sich zwischen den einzelnen Gruppen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich Bcl-2.



**Abbildung 19: Bcl-2-PCR**

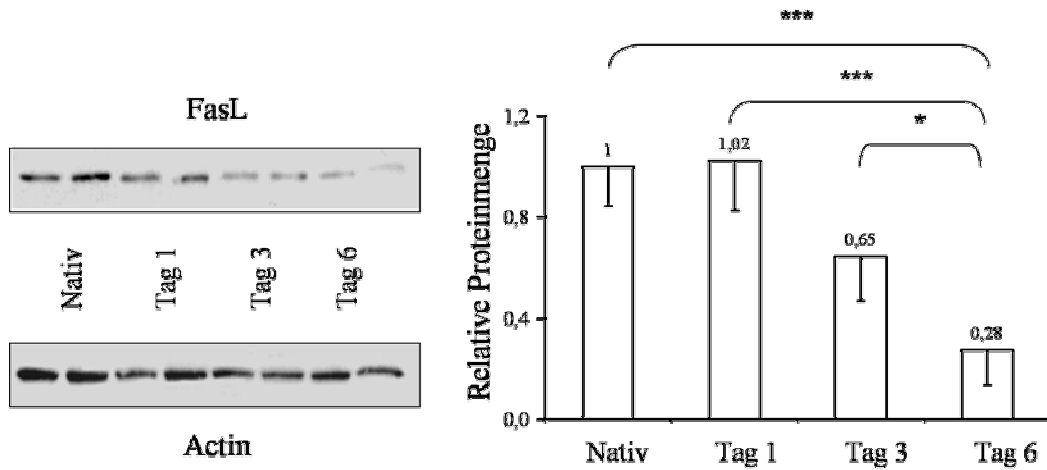
Links PCR-Produkte auf Agarosegel von Bcl-2 und PBGD (internes Standardgen). Exemplarisch werden 2 Proben je Untersuchungsgruppe in einem repräsentativen Gel gezeigt.

Rechts: Densitometrische Auswertung der PCR. Relative mRNA-Menge von Bcl-2 an den Tagen 1, 3 und 6 nach Transplantation bezogen auf native Kontrollherzen. MW  $\pm$  SEM (n=4/Gruppe)

## Ergebnisse

### 3.3.4 FasL

Mit Hilfe des Western Blots konnte die relative Proteinmenge von FasL am Tag 1, 3 und 6 nach Transplantation im Vergleich zu nativen Kontroll-Herzen bestimmt werden. Am Tag 6 erreichte die Reduktion von FasL ein Viertel des Ausgangswertes vor Transplantation. Dagegen bestand kein signifikanter Unterschied in der Frühphase der akuten Abstoßung zu nativen Kontroll-Herzen.



#### Abbildung 20: FasL

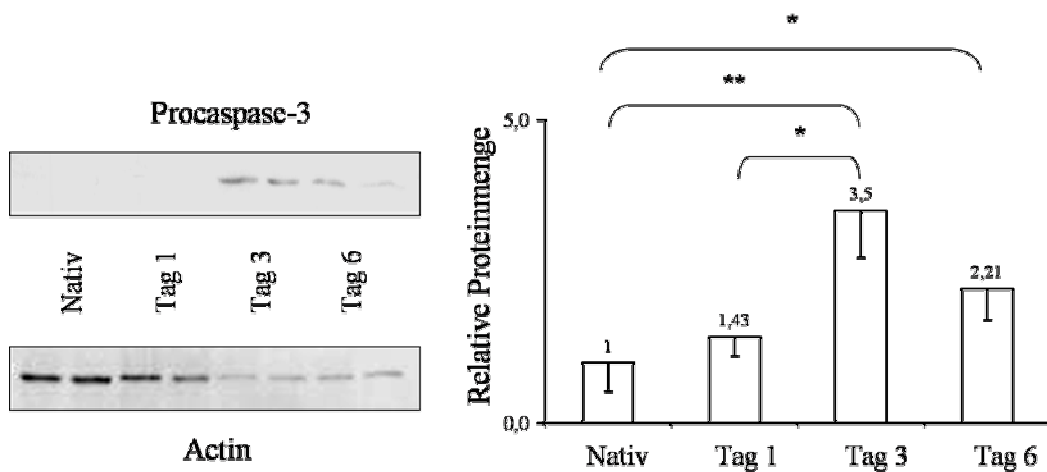
Links: Western Blot von FasL und Actin (internes Standardprotein). Exemplarisch werden 2 Proben je Untersuchungsgruppe in einem repräsentativen Gel gezeigt.

Rechts: Densitometrische Auswertung des Western Blots. Relative Proteinmenge von FasL an den Tagen 1, 3 und 6 nach Transplantation bezogen auf native Kontroll-Herzen.

MW  $\pm$  SEM (n=4/Gruppe) \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,001.

### 3.3.5 Caspase 3

Mit Hilfe des Western Blots konnte die relative Proteinmenge der inaktiven Caspase 3 (Procaspase 3) am Tag 1, 3 und 6 nach Transplantation im Vergleich zu nativen Kontroll-Herzen bestimmt werden. Am Tag 3 und Tag 6 zeigte sich ein signifikanter Anstieg von Procaspase 3 um das 2-3,5 fache des Ausgangswertes. Dagegen bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Tag 3- und Tag 6-Tieren.



**Abbildung 21: Procaspase-3**

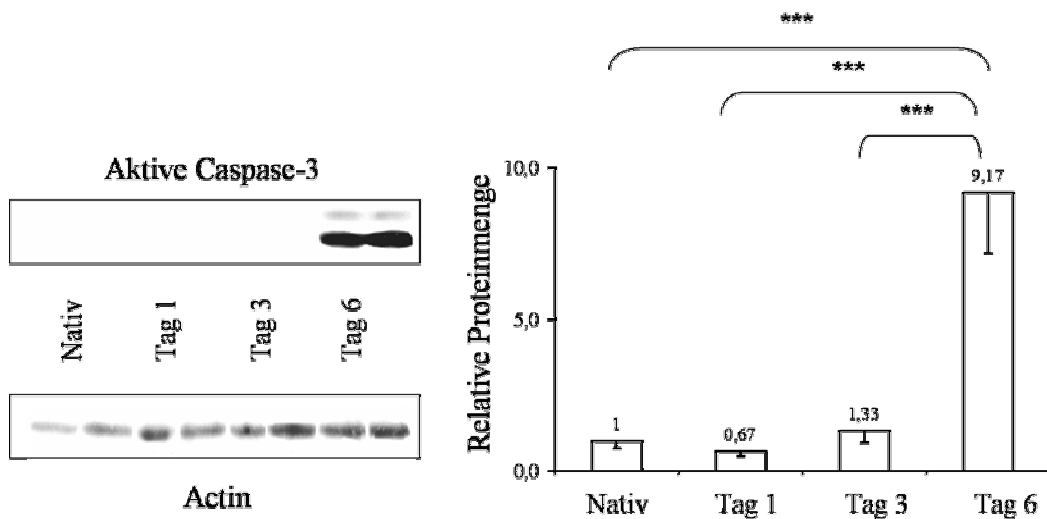
Links: Western Blot von Procaspase-3 und Actin (internes Standardprotein). Exemplarisch werden 2 Proben je Untersuchungsgruppe in einem repräsentativen Gel gezeigt.

Rechts: Densitometrische Auswertung des Western Blots. Relative Proteinmenge von Procaspase 3 an den Tagen 1, 3 und 6 nach Transplantation bezogen auf native Kontroll-Herzen. MW  $\pm$  SEM (n=4/Gruppe) \*p < 0,05, \*\*p < 0,01.

## Ergebnisse

Die Aktivierung der Caspase-3 erfolgt durch Proteolyse [84, 85]. Da bereits eine Zunahme der ungespaltenen Form ermittelt werden konnte, wurde mittels Western Blot auch die Proteinkonzentration der aktiven Form analysiert.

Mit Hilfe des Western Blots konnte die relative Proteinmenge von Caspase 3 am Tag 1, 3 und 6 nach Transplantation im Vergleich zu nativen Kontroll-Herzen bestimmt werden. Am Tag 1 zeigte sich ein signifikanter Anstieg von Caspase 3 um das ca. 9 fache des Ausgangswertes. Dagegen bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den nativen Kontroll-Herzen, Tag 1- und Tag 3-Tieren.



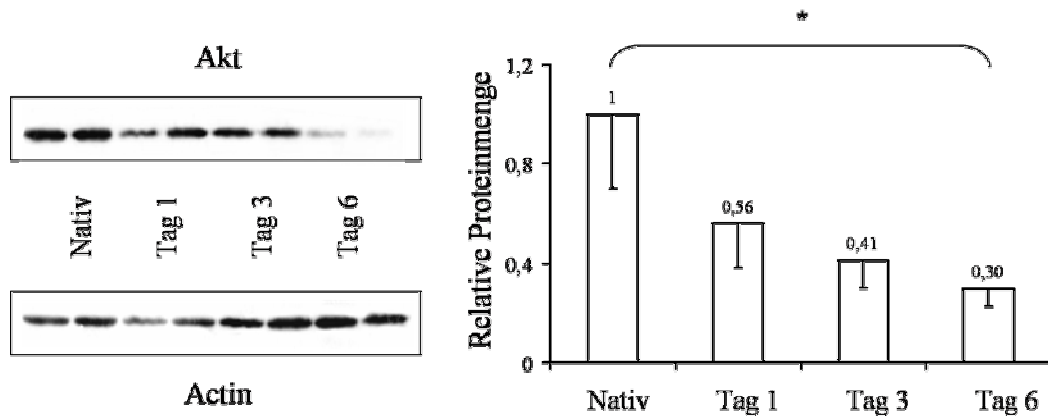
**Abbildung 22: Aktive Caspase 3**

Links: Western Blot von aktiver Caspase-3 und Actin (internes Standardprotein). Exemplarisch werden 2 Proben je Untersuchungsgruppe in einem repräsentativen Gel gezeigt.

Rechts: Densitometrische Auswertung des Western Blots. Relative Proteinmenge von Caspase 3 an den Tagen 1, 3 und 6 nach Transplantation bezogen auf native Kontroll-Herzen. MW  $\pm$  SEM (n=4/Gruppe) \*\*\*p < 0,001.

## 3.3.6 Akt

Mit Hilfe des Western Blots konnte die relative Proteinmenge von Akt am Tag 1, 3 und 6 nach Transplantation im Vergleich zu nativen Kontroll-Herzen bestimmt werden. Am Tag 6 erreichte die Reduktion von Akt ein Drittel des Ausgangswertes vor Transplantation. Dagegen bestand kein signifikanter Unterschied in der Frühphase und Intermediärphase der akuten Abstoßung zu nativen Kontroll-Herzen.



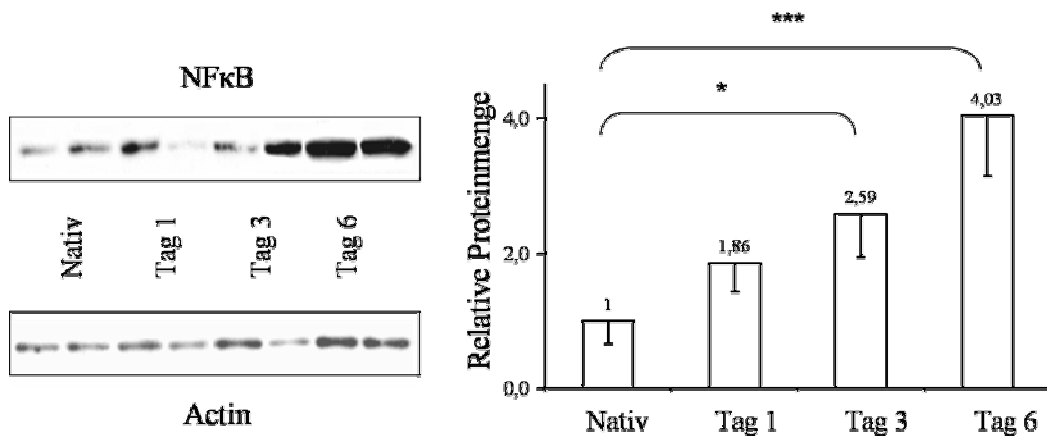
**Abbildung 23: Akt**

Links: Western Blot von Akt und Actin (internes Standardprotein). Exemplarisch werden 2 Proben je Untersuchungsgruppe in einem repräsentativen Gel gezeigt.

Rechts: Densitometrische Auswertung des Western Blots. Relative Proteinmenge von Akt an den Tagen 1, 3 und 6 nach Transplantation bezogen auf native Kontroll-Herzen. MW  $\pm$  SEM (n=4/Gruppe) \*p < 0,05.

### 3.3.7 NFκB und IκB

Mit Hilfe des Western Blots konnte die relative Proteinmenge von NFκB am Tag 1, 3 und 6 nach Transplantation im Vergleich zu nativen Kontroll-Herzen bestimmt werden. Es konnte ein signifikanter Anstieg von NFκB gefunden werden. Bereits am Tag 3 zeigte sich zu nativen Kontroll-Herzen ein signifikanter Anstieg von NFκB um das 3fache des Ausgangswertes, mit einer weiteren Zunahme am Tag 6 um das 4fache.



**Abbildung 24: NFκB**

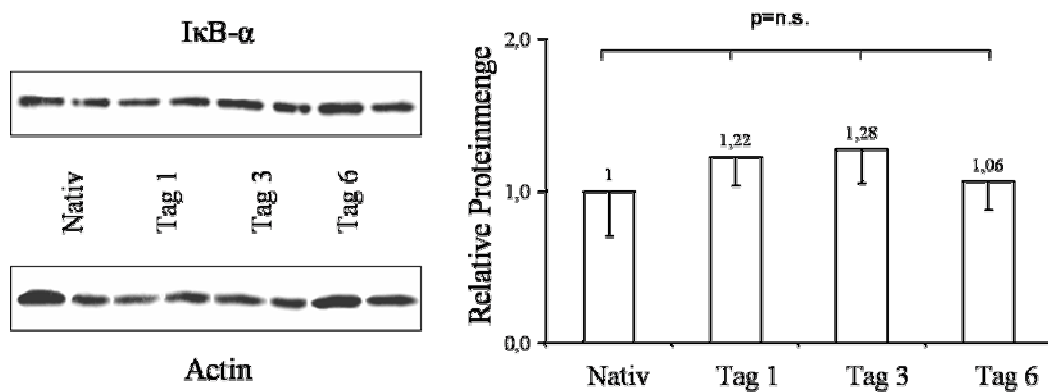
Links: Western Blot von NFκB und Actin (internes Standardprotein). Exemplarisch werden 2 Proben je Untersuchungsgruppe in einem repräsentativen Gel gezeigt.

Rechts: Densitometrische Auswertung des Western Blots. Relative Proteinmenge von NFκB an den Tagen 1, 3 und 6 nach Transplantation bezogen auf native Kontroll-Herzen. MW ± SEM (n=4/Gruppe) \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,001.



## Ergebnisse

Mit Hilfe des Western Blots konnte die relative Proteinmenge von I $\kappa$ B- $\alpha$  am Tag 1, 3 und 6 nach Transplantation im Vergleich zu nativen Kontroll-Herzen bestimmt werden. Im Gegensatz zu NF $\kappa$ B zeigte sich zwischen den einzelnen Gruppen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich I $\kappa$ B- $\alpha$ .



**Abbildung 25: I $\kappa$ B- $\alpha$**

Links: Western Blot von I $\kappa$ B und Actin (internes Standardprotein). Exemplarisch werden 2 Proben je Untersuchungsgruppe in einem repräsentativen Gel gezeigt.

Rechts: Densitometrische Auswertung des Western Blots. Relative Proteinmenge von I $\kappa$ B- $\alpha$  an den Tagen 1, 3 und 6 nach Transplantation bezogen auf native Kontroll-Herzen. MW  $\pm$  SEM (n=4/Gruppe)

## 4 Diskussion

Akute Abstoßung ist eine wesentliche Ursache der Mortalität, Morbidität und des Transplantatverlustes im ersten postoperativen Jahr nach Organtransplantation [1]. Akute Abstoßungsperioden prädisponieren des Weiteren zur Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie und somit zur chronischen Abstoßungsreaktion [129]. Da die Transplantationsmedizin immer mehr an Bedeutung gewinnt, ist es wichtig Wege zu finden, um diese Abstoßungsreaktionen zu verhindern.

Es gibt Hinweise dafür, dass neben Nekrose auch Apoptose an der akuten Transplantaterstörung beteiligt ist [118-120]. Apoptose verläuft im Gegensatz zu Nekrose in Stufen und ist deshalb möglicherweise beeinfluss- und umkehrbar [38, 40] und damit ein möglicher Angriffspunkt zur Verlängerung des Transplantatüberlebens.

Zur Untersuchung der Apoptose während der akuten, kardialen Abstoßung diene hier das Wistar-Furth zu Lewis heterotope Ratten-Transplantationsmodell. Wistar-Furth-Rattenherzen wurden entnommen und an die großen Bauchgefäße von Lewis-Ratten transplantiert. Das Transplantationsmodell ist ein vollständiges allogenes Tiermodell, das bezüglich der MHC-Klassen I und –II- zwischen Empfänger und Spender eine vollständige Inkompatibilität aufweist. Dieses entspricht der Situation im klinischen Alltag. Das Versuchstier Ratte wurde gewählt, da es sich hierbei um ein Säugetier handelt. Die Ratte ist genetisch gut charakterisiert und Inzucht Rattenstämme sind kommerziell erhältlich. Die Versuchstiere können unter Standardbedingungen in einem Tierstall in ausreichender Zahl zu vertretbaren Kosten gehalten werden. Bei der Organentnahme sind die gewonnenen Gewebeprobe groß genug, um unterschiedliche in-vitro Untersuchungen vorzunehmen. Darüber hinaus können die operativen Eingriffe von einem versierten Operateur mit exzellenter Erfolgsquote in vertretbarer Zeit durchgeführt werden [122]. In einem in-vivo Versuch wurde der Abstoßungszeitpunkt der Transplantate bestimmt. Darauf aufbauend konnte dann der Zeitpunkte definiert werden, wann die Organentnahme

## Diskussion

für die in-vitro Versuche erfolgen sollte um die Frühphase, die Intermediärphase und die Spätphase der Abstoßung untersuchen zu können.

### **Kernaussagen dieser Arbeit:**

- I** Ohne Immunsuppression erfolgte akute Transplantatabstoßung innerhalb von 7 Tagen.
- II** Die Transplantatabstoßung ging mit einer progredienten, mononukleären Infiltration im Gewebe des Transplantates einher. Das Transplantat erfuhr einen histologischen Umbau mit Zeichen eines Gewebsödems und Myozytenunterganges.
- III** In allogenen Transplantaten kam es zu einer Zunahme an apoptotischen Zellen von der Frühphase bis zur Spätphase der akuten Abstoßung. In Tag 6-Isotransplantaten konnten kaum apoptotische Zellen nachgewiesen werden.

Durch eine Doppelfärbung konnte bestimmt werden, welche Zellen in den allogenen Transplantaten apoptotisch waren. Es zeigte sich in allogenen Transplantaten am 6. postoperativen Tag Zeichen eines programmierten Zelltodes nahezu zu gleichen Anteilen sowohl in inflammatorischen Zellen als auch in Kardiomyozyten. Des Weiteren zeigten sich 6% aller Kardiomyozyten apoptotisch.

- IV** Um die Frage zu klären, welche Mechanismen an der intrazellulären Signaltransduktion zur Auslösung von Apoptose beteiligt sind, wurden verschiedene Faktoren untersucht:

#### **IV.1 iNOS-positive Zellen**

Immunhistochemisch ließ sich das NO-Synthese-Enzym iNOS im Myokard detektieren. Bereits an Tag 1 nach Transplantation nahm die Zahl der iNOS-exprimierenden Zellen mit Progredienz bis Tag 6 zu.

### **IV.2 Transkriptionsfaktor NFκB und sein Inhibitor IκB-α**

Die Konzentration von NFκB-Protein stieg signifikant bereits am 3. postoperativen Tag an. Sein Inhibitor IκB-α veränderte sich nicht in seiner Konzentration.

### **IV.3 Bax und Bcl-2**

- Bcl-2- und Bax-Protein: Es kam zu einem Konzentrationsverlust des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 und einer starken Zunahme an Bax bereits am 1. postoperativen Tag. Das Verhältnis von Bcl-2 zu Bax (Ratio Bcl-2/Bax) veränderte sich zugunsten des proapoptotischen Bax.
- Bcl-2-mRNA: Auf transkriptioneller Ebene veränderte sich die mRNA-Konzentration von Bcl-2 nicht. Damit gibt es Hinweise für die postrtranslationale Degradation von Bcl-2

### **IV.4 Caspase 3**

Die Cysteinprotease Caspase 3 ließ sich vermehrt in allogenen Transplantaten im Vergleich zu nativen Herzen nachweisen. Procaspase 3 nahm bereits am 3. postoperativen Tag signifikant zu. An Tag 6 kam es zu keiner weiteren Zunahme, aber zu einem ausgeprägten Anstieg von aktiver Caspase 3.

### **IV.5 FasL**

In den allogenen Transplantaten wurde FasL auf Proteinebene deutlich reduziert exprimiert.

### **IV.6 Akt**

Die Serin-Threonin-Kinase Akt verlor in den allogenen Transplantaten im Vergleich zu den nativen Organen an Konzentration.

#### **Zu I: Kinetik der Transplantatabstoßung**

Bei dem hier gezeigten Modell handelt es sich um ein vollständig allogenes Transplantationsmodell mit starken immunologischen Reaktionen. Ohne Immunsuppression erfolgte die akute Transplantatabstoßung innerhalb von 7 Tagen. Auch unter Immunsuppression kann es in diesem Modell noch nach 100 Tagen zu einer akuten Abstoßungsreaktion kommen. In einem nicht vollständig allogenen Modell, z. B. einem Lewis zu F 344-Modell von ADAMS et al., überlebten einige dieser Tiere nach Transplantation ohne Immunsuppression mind. 3 Wochen und ein Viertel der Tiere unendlich lange [130]. Die Überlebensrate der transplantierten Tiere konnte sogar mit Immunsuppression auf fast 100% gesteigert werden [130].

#### **Zu II: Zelluläre Infiltration bei akuter Transplantatabstoßung**

Als Zeichen der Immunreaktion kam es zu einer progredienten zellulären Infiltration des Gewebes. Der Anstieg der infiltrierenden Zellen führte zu einem histologischen Umbau des Gewebes mit Zeichen eines Gewebsödems und Myozytenunterganges. Die immunhistochemische Differenzierung und Quantifizierung der immunologischen Zellen ergab eine Zunahme an T-Zellen und Makrophagen im Gewebe [11].

#### **Zu III: Nachweis des apoptotischen Zelltods**

Hier in diesem kardialen Transplantationsmodell konnte Apoptose in den allogenen Transplantaten nachgewiesen werden. Bereits in der Frühphase der akuten Abstoßung kam es im Vergleich zu den nativen Organen zu einer

## Diskussion

Zunahme an apoptotischen Zellen. An Tag 1 nach Transplantation, bei der keine wesentliche histologische Abstoßung festzustellen war, war der Anstieg der apoptotischen Zellen vermutlich Folge des Ischämie und Reperfusionsschadens. Darauf weisen Versuche von OBERBAUER et al. hin, die in einem Rattenmodell zu verschiedenen Zeitpunkten den Einfluß eines Ischämieschadens auf explantierte, native Nieren nach Abklemmung der zuführenden Gefäße zeigten. An Tag 1 nach Ischämie konnten sie im Vergleich zu den Folgetagen die maximale Zahl apoptotischer Parenchymzellen detektieren [131]. Dagegen konnte hier in diesem Modell die steigende Zahl apoptotischer Zellen in der Intermediär- und Spätphase der akuten Abstoßung an Tag 3 und 6 als Folge der Allogenität gesehen werden. Entsprechende Versuche mit Isotransplantaten, die in gleicher Weise operiert wurden, und keine Unterschiede in der MHC-Ausprägung zw. Spender und Empfänger hatten, zeigten nur eine geringe Menge an apoptotischen Zellen an Tag 6 nach Transplantation.

Es wird kontrovers diskutiert, ob in der Pathogenese von kardialen Erkrankungen Nekrose oder Apoptose die Hauptursache des Kardiomyozytenverlustes ist [40]. Der entscheidene Unterschied von Apoptose zu Nekrose liegt darin begründet, dass Apoptose im Gegensatz zu Nekrose ein aktiver Prozess ist, der reversibel ist und somit Ansätze zur Immunmodulation bietet [40]. Apoptotischer Zelltod wurde bei unterschiedlichen kardialen Erkrankungen wie Arteriosklerose, Myokarditis, arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie, dilatative Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz beschrieben [119, 132-134]. Obwohl Apoptose bei diesen Erkrankungen deskriptiv nachgewiesen werden konnte, ist ihre kausale Rolle unklar. Dies gilt auch im Zusammenhang mit akuter Transplantatabstoßung [135]. Die Relevanz von Apoptose im Verlauf der akuten Abstoßung unterscheidet sich in verschiedenen Studien. Differenzen im Versuchsaufbau [136], dem Tiermodell (Maus, Ratte etc.), der Verwendung von Immunsuppressiva, der Erfassung apoptotischer Zellen [137] oder der zeitlichen Komponente der Analysen könnten die Ursache dafür sein [138]. Die Zunahme von apoptotischen Zellen in abgestoßenen Transplantaten ist kein zufälliges Ereignis, sondern wird durch Versuche untermauert, die durch Reduktion des programmierten Zelltodes im Parenchym, z. B. durch Gentransfer, eine

## Diskussion

Verlängerung des Transplantatüberlebens erreichen konnten [139, 140]. Andere Ergebnisse lassen jedoch auch andere Rückschlüsse zu. KOWN et al. reduzierten durch Bcl-2-Gentransfer die Apoptoserate und Caspase-3-Aktivität in Rattenherzen ohne jedoch eine Verzögerung oder Verhinderung der akuten Abstoßung erreichen zu können [141]. In humanen endomyokardialen Biopsien, die von YOLLOW et al. durchgeführt wurden und nach den ISHLT-Kriterien in Grad 3A eingeteilt wurden, beschränkte sich der programmierte Zelltod auf mononukleäre Zellen, möglicherweise als Ausdruck der Aktivierung von transplantatinfiltrierenden Zellen [142]. Dagegen sprechen Versuche unserer Arbeitsgruppe, die bei c3Ado-behandelten Tieren (3-Deazaadenosin, ein Methylierungsinhibitor) eine Reduktion zellulärer Infiltrationsmarker und eine Reduktion immunkompetenter Zellen nachweisen konnten, in denen sich jedoch keine Abnahme der apoptotischen Zellzahl und kein verlängertes Zellüberleben zeigten [11]. Um die Rolle von Apoptose während der Transplantatabstoßung genauer verstehen zu können, ist es wichtig zu wissen, welche Zellen (Parenchym- oder Immunzellen) betroffen sind. Apoptose kann im Parenchym von zahlreichen Organen, z. B. Leber und Niere, nach Transplantation detektiert werden [118, 120]. Hier in diesem Modell konnte Apoptose in der Spätphase der akuten Abstoßung (dies entspricht ISHLT Grad 4A mit zellulärer Infiltration und lichtmikroskopisch sichtbarer Nekrose) in 6% der Herzmuskelzellen nachgewiesen werden, d. h. jede 15. Zelle wies programmierten Zelltod auf. Der nachgewiesene Anteil der apoptotischen Zellen an Tag 6 spiegelte nur einen geringen Anteil der abgestorbenen Zellen wider, da die „apoptotischen Körperchen“ im Allgemeinen nur ca. 1-2 Stunden sichtbar sind bevor sie phagozytiert werden [143]. Neben den apoptotischen Kardiomyozyten konnte hier in diesem Modell in der gleichen Ausprägung auch apoptotische Immunzellen nachgewiesen werden.

In menschlichen Kardiomyozyten gilt Apoptose in einzelnen Studien als ein signifikanter Mechanismus für den Herzmuskelzelltod während der allogenen Abstoßung [135, 144, 145]. Es besteht möglicherweise eine direkte Korrelation zwischen einem gesteigerten kardialen Zelltod und dem Grad der Abstoßung [146]. Sowohl die Zahl infiltrierender Zellen als auch die Zahl apoptotischer

## Diskussion

Zellen stieg bei VAN HOFFEN et al. in humanen Herzgewebe mit moderater und ausgeprägter Abstoßung mit dem Grad der Abstoßung [136]. In diesem Sinne erschien Apoptose Verursacher eines Parenchymschadens und nachfolgend des Transplantatverlustes zu sein [147]. Aufgrund der begrenzten Fähigkeit dieser Zellen zur Proliferation kann selbst ein geringer Kardiomyozytenverlust eine reduzierte kardiale Funktion und die Entstehung von Herzversagen verursachen [148]. Die apoptotischen Immunzellen treten möglicherweise im Rahmen des physiologischen Abbaus aktivierter Immunzellen auf, oder spiegeln die Abwehr der Spenderimmunzellen gegen den Empfänger wider. Durch Entfernung Spender-spezifischer T-Zellen, wird Apoptose eine Rolle als Mechanismus zur Erhaltung von Transplantatakzeptanz zugeschrieben [147]. Bei BERGESE et al. wiesen tolerierte Allotransplantate im Gegensatz zu abgestoßenen Allotransplantaten eine starke Anzahl apoptotischer Zellen auf. Es wurde vermutet, dies sei ein Mechanismus für Immunmodulation, die entweder zur Transplantatakzeptanz oder zu einem chronischen Gefäßumbau führt [149]. Entsprechend ging in einem akuten, kardialen Rattenmodell ein gesteigertes Transplantatüberleben mit der Zunahme der Apoptoserate einher [150]. Bei MASRI et al. persistierte ebenfalls eine erhöhte Zahl TUNEL-positiver inflammatorischer Zellen und eine vermehrte Caspaseaktivität über die histologische Auflösung der Abstoßungsepisode hinaus [151]

### **Zu IV.1: Induzierbare NO-Synthase**

iNOS ist die induzierbare Isoform der Familie der Nitritoxidase Synthasen, welche intrazellulär die Bildung von Stickstoffmonoxid katalysieren [114]. Es ist bekannt, dass iNOS in zahlreichen Zellarten Apoptose durch die Induktion von NO zur Folge hat [78]. Hier in diesem Modell konnte eine Zunahme iNOS-positiver Kardiomyozyten im Verlauf der akuten Abstoßung gesehen werden. Die vermehrte Bildung von iNOS war vermutlich Folge der transkriptionellen Hochregulierung durch NF $\kappa$ B [152-154], im Sinne einer proapoptotischen Rolle mit gesteigerter Synthese von NO. Eventuell führte die Stimulierung der Zellen durch Interferon  $\gamma$ , Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) zur iNOS-Produktion [155]. Zum Beispiel ist TNF in der Lage NF $\kappa$ B zu aktivieren



## Diskussion

und damit die Initiation der NF $\kappa$ B-Gene auszulösen (s. Abbildung 7) [74]. Es konnte in unserer Arbeitsgruppe eine Zunahme von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  mittels PCR in den allogenen zu nativen Herzen nachgewiesen werden [156].

Wahrscheinlich spielt iNOS im Rahmen der akuten Abstoßung eine signifikante Rolle [144, 155, 157]. Im Verlauf der akuten Abstoßung von Kardiomyozyten wird eine direkte Korrelation zwischen der Expression von iNOS und Apoptose vermutet [144]. Die Induktion von iNOS in isolierten Ratten-Kardiomyozyten durch Zytokine war assoziiert mit einer gesteigerten Todesrate dieser Zellen [158]. Im Gegenzug konnte eine Reduktion von iNOS zu einer Verminderung der inflammatorischen Zellzahl sowie einer geringeren Kardiomyozytenschädigung während der Abstoßung von Rattenherzen führen [11, 116]. Die intraperitoneale Behandlung von Alлотransplantat-Empfängern mit einem iNOS-Hemmstoff sorgte für eine Verlängerung des Transplantatüberlebens, NO wurde bei diesen Organen in verminderter Konzentration nachgewiesen [157]. In einem kardialen Mausmodell mit iNOS-defizienten Empfängern konnte, parallel mit einer reduzierten Parenchymabstoßung, eine geringere DNA-Fragmentation gezeigt werden. Außerdem zeigten sich niedrigere Caspase-1 und -3-Spiegel und eine reduzierte Caspase-3-Aktivität [147]. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass iNOS in apoptotischen Kardiomyozyten mit einer gesteigerten Expression von Bax einhergeht, jedoch die Bcl-2-mRNA von iNOS unbeeinflusst bleibt [115].

Möglicherweise können NO oder NO-verwandte Moleküle in Abhängigkeit von Zelltyp und Stimulus auch einen antiapoptotischen Effekt ausüben. NO, synthetisiert von NOS, wurde als Hemmstoff für Fas-Signale beschrieben und somit als Inhibitor für proapoptotische Faktoren angesehen [159]. Die Hemmung von NOS führte daher zu einer gesteigerten, Fas-induzierten Caspase-Aktivierung [159]. Eventuell ist NO und somit iNOS in der Lage programmierten Zelltod entweder zu induzieren oder zu unterdrücken, je nach lokaler Konzentration und umgebendem Redoxmilieu [147].

### **Zu IV.2: Transkriptionsfaktor NFκB und sein zytoplasmatischer Inhibitor IκB**

NFκB ist ein Transkriptionsfaktor, der die Transkription zahlreicher Gene reguliert, unter anderem Interleukine, TNF oder FasL [53-56, s. Abbildung 7]. In dieser hier gezeigten Arbeit konnte ein Anstieg von NFκB und eine vermehrte Expression eines NFκB regulierten Gens (iNOS) festgestellt werden.

Es gibt Hinweise darauf, dass die Aktivierung von NFκB in Inflammation, aber auch in Transplantatabstoßung und -vaskulopathie involviert ist [160, 161]. Hinsichtlich der Bedeutung des Transkriptionsfaktors bei Apoptose sind die Daten indessen widersprüchlich. In der Behandlung von Neoplasien wird vermutet, dass einige Chemotherapeutika weniger effektiv in der Auslösung des programmierten Zelltodes auf Grund ihrer gleichzeitigen Aktivierung von NFκB sind [162]. Zum Beispiel scheint Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) in der Lage zu sein Apoptose auszulösen. Jedoch zeigten Zellkulturversuche mit Ratten-Kardiomyozyten, dass dieses erst nach Hemmung von NFκB erfolgte [74]. Eine Aktivierung von NFκB kann seinerseits möglicherweise Mageneithel vor *Helicobacter pylori* induzierter Apoptose schützen [163].

Neben dieser antiapoptotischen Rolle wird von einigen Autoren auch die Funktion von NFκB in der Auslösung des programmierten Zelltodes beschrieben [164]. Eine Inhibierung der NFκB-Aktivierung resultierte in einem Langzeitüberleben von kardialen Ratten-Transplantaten in einem WF-zu-LEW-Modell [157]. Eine geringere T-Zellinfiltration und eine gehemmte Hochregulierung von Chemokinen und Zytokinen während der Endphase der Abstoßung konnte in einem kardialen Mausmodell bestimmt werden [165]. In mit Adenoviren befallenen Leberzellen verursachte NFκB Apoptose über die Transkription des „Todesrezeptors“ Fas [80]. GRIMM et al. lösten in humanen embryonalen Nierenzellen nach Aktivierung von NFκB den programmierten Zelltod aus, dieser konnte durch den Einfluss von Bcl-2 unterdrückt werden [166].

In dem hier untersuchten Modell kam es zu einem Anstieg von NFκB und seiner Aktivität bis zum 6. Tag nach Transplantation. Dieses wurde in unserer

## Diskussion

Arbeitsgruppe bestätigt durch den Anstieg weiterer NFκB-kontrollierter Gene (s. [11, 156]). Ob der hier zu messende NFκB-Anstieg auf Grund seiner proapoptotischen Funktion erfolgt, ist noch nicht eindeutig zu klären. Dafür sprechen würde, dass proapoptotische Zielgene wie z. B. iNOS, das von NFκB reguliert wird, nach Aktivierung von NFκB in ihrer Konzentration anstiegen. Es wird spekuliert, dass die pro- oder antiapoptotische Wirksamkeit von NFκB stärker abhängig vom Auslöser als von der Zellart ist [80, 167]. Ein anderer Grund für die pro- oder antiapoptotische Funktion von NFκB in Apoptose könnte durch die Dauer der Aktivierung von NFκB bedingt sein [166]. Beispielsweise wiesen Zellkulturen, die durch TNF stimuliert wurden und nur eine kurze NFκB-Aktivierung über Stunden aufzeigten, keinen programmierten Zelltod auf. Möglicherweise wird eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors über Tage zur Apoptose-Induktion benötigt [166].

Die Aktivierung von NFκB wird durch seinen zytoplasmatischen Inhibitor, *Inhibitor of Nuclear factor κB* (IκB), reguliert [74, 75]. In dem hier gezeigten Modell erfolgte jedoch die Stimulierung von NFκB ohne messbaren Konzentrationsverlust von IκB. Folgende Gründe sind möglicherweise dafür verantwortlich:

- Als Antwort auf eine Zellstimulation wird rasch eine Proteinkinase, die IκB-Kinase (IKK), aktiviert, diese führt dann zur Dissoziation des NFκB-IκB-Komplexes [79]. IκB wird phosphoryliert und dadurch inaktiviert. Ein Verlust an aktiviertem IκB ist hier in diesem Modell nicht nachweisbar. Dies kann eventuell daran liegen, dass die Menge an IκB bereits am 1. Tag durch vermehrte Produktion ausgeglichen wird. Sehr wahrscheinlich ist NFκB für die transkriptionelle Aktivierung des IκB-α-Gens verantwortlich [113]. Die schnelle Reakkumulation von IκB-α nach seinem Verlust ist vermutlich wichtig für die Entstehung erneuter zytoplasmatischer NFκB / IκB-Komplexe [113].
- Die verschiedenen Isoformen von IκB scheinen differente NFκB-Einheiten zu binden [168]. (Z. B. verbinden sich IκB-α und IκB-β bevorzugt mit

## Diskussion

p50 / RelA und p50 / c-Rel-Heterodimere, I $\kappa$ B- $\epsilon$  dagegen mit RelA und c-Rel Homodimere [168]). Möglicherweise erfährt in dem hier gezeigten Modell I $\kappa$ B- $\beta$  statt I $\kappa$ B- $\alpha$  eine Konzentrationsänderung.

- Neben der Phosphorylierung, Ubiquitinylierung und Degradation von I $\kappa$ B gibt es noch weitere Mechanismen, die zur Trennung von NF $\kappa$ B und I $\kappa$ B und der Aktivierung von NF $\kappa$ B führen können [169]. Die NF $\kappa$ B-Aktivierung kann unabhängig von der proteolytischen Degradation von I $\kappa$ B- $\alpha$  sein [170].

### **Zu IV.3: Der Einfluß von Bcl-2 und Bax**

Von Kardiomyozyten ist bekannt, dass sie Mitglieder der Bcl-2-Familie exprimieren, aber das Ausmaß in welchem sie Apoptose im Herzen beeinflussen können, ist noch nicht vollständig geklärt [40]. Besonders wichtig für die Auslösung des programmierten Zelltodes scheint das Verhältnis der Proteine Bcl-2 zu Bax zu sein. Der Ausgleich der relativen Konzentration von Bcl-2 zu Bax scheint dafür verantwortlich, dass sich die Zelle in einem Gleichgewicht befindet [88]. Wird Bax gesteigert produziert, erscheint die Zelle gegenüber Todessignalen empfänglicher. Ist Bcl-2 im Überschuss vorhanden, überwiegt der Schutz der Zelle vor dem Tod [59, 60]. Die Schwelle der Rate von Bcl-2 / Bax, ab der Apoptose in Kardiomyozyten ausgelöst werden kann, ist nicht bekannt. Dennoch weist ein vermindertes Verhältnis von Bcl-2 / Bax auf eine gesteigerte Wahrscheinlichkeit hin, dass Kardiomyozyten den programmierten Zelltod erreichen [171]. In dem hier verwendeten Modell nahm das Verhältnis von Bcl-2 zu Bax im Laufe der Abstoßungsperiode um das 41fache ab und führte darüber möglicherweise zum programmierten Zelltod.

Betrachten wir die beiden Faktoren jeden für sich, so zeigte sich hier in diesem Modell eine Abnahme von Bcl-2-Protein ohne Veränderung der Bcl-2-Konzentration auf transkriptioneller Ebene, das Protein Bax nahm dagegen stark zu. Auf transkriptioneller Ebene präsentierte SHINTAKU et al. in einem Lebertransplantationsmodell von Ratten, wie in diesem Modell, keinen Unterschied in der Bcl-2-mRNA-Menge zwischen Kontrolltieren und

## Diskussion

Allotransplantaten. [172]. Dagegen wurde in einem kardialen Rattenmodell eine Abnahme der Bcl-2-Genexpression beschrieben [173] und von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt als mögliche Folge eines Ischämie- und Reperfusionsschadens [174]. Durch Bcl-2-Gentransfer konnte apoptotischer Zelltod nach Ischämie- oder Reperfusionsschädigung sogar gemindert werden [175].

Dass akute Abstoßung mit einem Konzentrationsverlust von Bcl-2-Protein einhergeht, wie hier in diesem Modell festgestellt werden kann, könnte mit einer Theorie von YAMAMOTO et al. in Einklang gebracht werden. Diese bringen ein Fehlen von Bcl-2 in Ratten-Hepatozyten mit einer verminderten Resistenz gegenüber Apoptose bei akuter Abstoßung in Beziehung [176]. Eine Zunahme an apoptotischen Kardiomyozyten und eine gesteigerte Expression an Bcl-2-Protein konnte dagegen in Gewebe bei progressiver Herzinsuffizienz gefunden werden [134]. In diesem Zusammenhang vermuten AUKRUST et al, dass die antiapoptotische Wirkung von Bcl-2 durch eine gesteigerte Aktivierung proapoptotischer Wege (z. B. Bax) ausgeglichen wird und dadurch programmierter Zelltod resultiert [132].

Eine Möglichkeit für den Verlust an Bcl-2-Protein ohne Veränderung der Bcl-2-mRNA-Konzentration in dem hier gezeigten Modell, ist die Spaltung in ein kleineres Molekül (proteolytische Degradation). CHENG et al. diskutierten in ihrer Arbeit, dass Bcl-2 durch Caspase-3 gespalten werden und dass das Spaltprodukt programmierten Zelltod auslösen kann [54]. In diesem Sinne war eine Überexpression von Caspase-widerstandsfähigem-Bcl-2 in Endothelzellen vermutlich in der Lage, das Ausmaß des Zellsterbens, verursacht durch alloreaktive zytotoxische T-Zellen, stark zu reduzieren [177]. Gleichzeitig mit der Aktivierung von Caspase 3 war hier in dieser Arbeit ein signifikanter Verlust von Bcl-2-Protein nach posttranslationaler Degradation messbar. Jedoch zeigte sich aktive Caspase 3 erst an Tag 6 in höherer Konzentration im Vergleich zu den native Organen, die proteolytische Degradation von Bcl-2 erfolgte jedoch bereits früher.

## Diskussion

Bax wird eine Beteiligung am intrinsischen Apoptoseinduktionsweg über die Aktivierung von Caspasen nachgesagt. Bereits an Tag 3 erreicht das Protein seine maximale Konzentrationssteigerung. Andere Proteine werden an Tag 3 und Tag 6 durch Bax aktiviert und können zum Endpunkt der Transplantatabstoßung (Tag 6) Apoptose induzieren. Bei allogener Lebertransplantatabstoßung von Ratten zeigten erhöhte Bax-mRNA- und Protein-Werte im Vergleich zu Isotransplantaten die Regulation des programmierten Zelltodes durch Bax an [178]. In humanen endomyokardialen Biopsien konnte Bax in der Mehrzahl der apoptotischen Zellen detektiert werden [136]. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in humanen Nierentransplantaten nach Ischämie- oder Reperfusionsschädigung gefunden [179]. In Rattenherzen konnte durch einen Ischämie- und Reperfusionsschaden vermehrt Bax exprimierende Zellen gezählt werden [180]. Eventuell ist die hier festzustellende Zunahme von Bax Folge der Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 durch NFκB, der proapoptotische Gene wie Bax reguliert. Durch den Verlust an Bcl-2 in unserem Modell kam es möglicherweise zu einer Reduktion des hemmenden Einflusses von Bcl-2 auf die NFκB-Aktivität, wie von GRIMM et al. beobachtet (s.o.) [166]. Die proapoptotischen Proteine iNOS und Bax erfahren dadurch eine Steigerung an ihrer Konzentration.

### **Zu IV.4: Endpunkt Caspase 3**

Als ein Punkt ohne Wiederkehr in der apoptotischen Todeskaskade wird die Umwandlung von Procaspase 3 in seine aktive Form (Caspase 3) angesehen [181]. Wird Caspase 3 (ausgelöst durch Bax oder FasL) aktiviert, katalysiert es die Umwandlung der morphologischen Veränderungen in einer apoptotischen Zelle [53]. Caspase 3-Substrate, wie Endonukleasen, Kinasen, Zytoskelett-, Kernmatrix- oder DNA-Reparaturproteine, werden aktiviert und verändern die Zelle in der apoptosetypischen Weise [54-58]. Im dem hier angewandten Modell konnte eine Zunahme von Procaspase 3 und Caspase 3 festgestellt werden. Im Rahmen der Immunreaktion wird zunächst Procaspase 3 mit einer signifikanten Zunahme an Tag 3 gebildet. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich dagegen erst spät, zu dem Zeitpunkt an dem die Transplantatfunktion verloren geht, die Bildung von aktiver Caspase 3. Erst an Tag 6 degradierte somit Procaspase 3 als Endpunkt

## Diskussion

vorausgegangener intrazellulärer Abläufe in sein aktives Enzym. Mit Progredienz der Caspase 3 Konzentration kam es auch zur Zunahme der DNA-Fragmentierung (s. Apoptosenachweis).

Verschiedene Studien bestätigen die Annahme, dass programmierter Zelltod nach Transplantation eine Aktivierung von Caspasen erfordert [135, 182, 183]. Im Verlauf der Transplantatabstoßung kam es z. B. in humanen endomyokardialen Biopsien zu einer Zunahme an Caspase 3 [151]. Mehrere Arbeitsgruppen versuchten durch Beeinflussung von Caspase 3 Transplantatüberleben und -funktion zu verbessern. NAKANO et al. konnten akute Abstoßung in einem Xenotransplantationsmodell (Untersuchungen von humanen Inselzellen nach Transplantation in Mäuse) durch Caspaseinhibition verzögern [184]. In intestinalen Ratten-Transplantaten (allogene Transplantate) konnte Apoptose gehemmt und histologische Schäden im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe vermindert werden [185]. Ein Caspase-Inhibitor einer anderen Arbeitsgruppe reduzierte die Ischämie- und Reperfusionsschädigung und verbesserte die Überlebenszeit nach Transplantation [182].

Wie der Schutz der Transplantate nach Caspase-Hemmung erfolgt, ist nicht bekannt, möglicherweise indirekt über eine Erhöhung der Bcl-2-Expression [182]. In kardialen Transplantaten zeigte sich nach Caspase-3-Inhibierung eine Hochregulierung der Bcl-2-mRNA [174]. Entsprechende Ergebnisse wurden auch in Lebertransplantaten gefunden [182]. Die Hochregulierung von Bcl-2-mRNA soll über eine Tyrosinkinase erfolgen, die durch Caspase-3 gehemmt werden kann [174].

### **Zu IV.5: Extrazellulärer Faktor FasL**

Zu den physiologischen Aufgaben des Fas/FasL-Systems soll die Eliminierung von alten und kranken Zellen durch Apoptose gehören. Des Weiteren soll Fas/FasL im Verlauf der Entwicklung (Embryonalphase) eine wichtige Rolle spielen. Die Funktion von FasL während der akuten Abstoßung ist unklar, divergierende Ergebnisse wurden bereits gefunden. Z. B. konnten PORTER et al. in allogenen Nierentransplantaten eine Konzentrationsabnahme von FasL

## Diskussion

beschreiben [186]. Dagegen war in anderen Versuchen eine erhöhte FasL-Genexpression und gesteigerte FasL-Proteinkonzentration nach Transplantation messbar [187-189]. Obwohl es bei LARSEN et al. ebenfalls zu einer Hochregulierung von FasL in kardialen, allogenen Transplantaten kam, konnte die Abwesenheit des Fas / FasL-Systems das Tempo der Abstoßung nicht beeinflussen [190].

In dem hier beschriebenen Modell kam es im Verlauf der akuten Abstoßung zum Verlust an FasL, obwohl die Zahl apoptotischer Zellen und die Menge an Caspase 3 während der akuten Abstoßung zunahm. Zunächst blieb die Menge an FasL gleich, erst im Intermediärstadium (Tag 3) nahm die Konzentration ab. Mehrere Möglichkeiten können für den Verlust verantwortlich sein:

1. FasL spielt in dem hier beschriebenen Modell keine Rolle in der Apoptoseinduktion. Möglicherweise wurde die von einigen Arbeitsgruppen, z.B. bei LARSEN et al., gemessene Hochregulation von FasL durch andere, nicht bekannte Mechanismen herbeigeführt. Das würde auch erklären, warum FasL erst an Tag 3 an Konzentration verliert. Zunächst wird ein anderer Mechanismus aktiviert. Ein Faktor, der die Aktivierung von FasL unterstützen soll, ist der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B [81]. Dieser ist jedoch in diesem hier gezeigten Modell während der Abstoßung in steigender Konzentration messbar, scheint jedoch nicht zu einer erhöhten Transkription von FasL zu führen.

2. Entsprechend den Untersuchungen in Zellen der vorderen Kammer des Auges (s. Einleitung) könnte FasL als protektiver Mechanismus die Parenchymzellen vor einer schädigenden Immunantwort schützen [105]. Die Expression von FasL in Kardiomyozyten könnte eventuell durch Bindung an Fas-tragende-Leukozyten (*kiss of death*) deren Apoptose auslösen. FasL konnte sowohl in infiltrierenden, mononukleären Zellen, als auch in Hepatozyten und Kardiomyozyten nachgewiesen werden [188, 191]. Kommt es jedoch zur Abnahme an FasL können die Immunzellen nur in geringerem Maße eliminiert werden, das Transplantat wird abgestoßen.



## Diskussion

3. Die Produktion von FasL in vaskulärem Endothel verhindert die Migration von Leukozyten, wahrscheinlich durch Apoptose-Aktivierung in den Immunzellen. Während einer Entzündungsreaktion wird FasL im vaskulären Endothel herunterreguliert und sorgt dadurch für eine erhöhte Permeabilität der inflammatorischen Zellen in der Gefäßwand [192]. Möglicherweise erfolgte die hier gemessene Abnahme an FasL im Rahmen der begleitenden Entzündungsreaktion wie eben beschrieben.

4. Eine andere Erklärung ist möglicherweise, dass FasL nach proteolytischer Spaltung in seine lösliche Form übergegangen ist [186]. Von der löslichen Form wurde berichtet, dass es den Fas-Rezeptor blockieren kann, ohne ein intrazelluläres Signal auszulösen, aber als chemotaktischer Botenstoff für Immunzellen wirksam ist [193, 194]. Es degradiert in die lösliche Form und funktioniert im Rahmen der Inflammation im Sinne eines Chemokines.

Verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit der These, dass Transplantatabstoßung über FasL verhindert werden kann [195, 196]. In Versuchen mit FasL-Gentransfer erhielt KE et al. in einem Nagetier-Nierenmodell ein verlängertes Transplantatüberleben, eine niedrigere mononukleäre Zellinfiltration und veränderte Zytokin-Gen-Expressionen [139]. Genauso konnten SWENSON et al. durch einen ähnlichen Mechanismus akute Abstoßung von Rattennieren verzögern und die Organfunktion verbessern, die zelluläre Infiltration blieb jedoch unverändert [140]. Andere Studien dagegen zeigen, dass Fas / FasL mehr zur Auslösung von Abstoßung als zur Prevention beisteuert [197, 198]. Eine Blockade der Fas-FasL-Interaktion verbesserte das Organüberleben von allogenen Lebertransplantaten über eine Apoptosereduktion [199]. Die direkte FasL-Expression erwies sich bei MIWA et al. als toxisch und führte zur Zerstörung der Transplantate, Zytokinfreisetzung und Leukozyteninfiltration [200]. Um die unterschiedlichen Ergebnisse zu verstehen ist es sicherlich entscheidend zu wissen, welche Zellen das Protein exprimieren und mit welcher Konsequenz. Immunzellen bilden FasL zur Abwehr von Viren, Bakterien und karzinomatösen Zellen. Auf Tumorzellen scheint es jedoch als Schutz vor dem Immunsystem zu dienen. TAKEUCHI et al. beschrieben, dass FasL-tragende

## Diskussion

allogene Kardiomyozyten nach Transplantation eine rasche Abstoßung erlitten [201]. JOSIEN et al. fanden in Allotransplantaten einen starken Anstieg an FasL-Protein. Dieser Anstieg ging dagegen mit einem Anstieg von Apoptose in transplantatinfiltrierenden Zellen einher, jedoch nicht in Kardiomyozyten. [138].

### **Zu IV.6: Regulator Proteinkinase Akt**

Die Proteinkinase Akt ist in zahlreichen Geweben nachweisbar und übernimmt in Zellen eine protektive Funktion durch Regulation intrazellulärer Mechanismen. Es wurden verschiedene Hormone, Wachstumsfaktoren und Zytokine identifiziert, die kardioprotektiv vor schädigenden Einflüssen, z. B. oxidativem Stress oder Ischämie und Reperfusion, über die Aktivierung von Akt wirken [202]. Zum Beispiel reduzierte Akt in einem kardialen Ischämie / Reperfusionsmodell von Ratten die apoptotische Zellzahl, die Infarktgröße und verbesserte die regionale Herzfunktion [203]. Substanzen wie Kallikrein zeigten einen positiven Effekt über die Aktivierung von Akt auf Ischämie / Reperfusion-geschädigte Herzen [148]. Apoptose konnte in Kardiomyozyten durch Transduktion von Akt in Mäuseherzen nach Ischämie / Reperfusion verhindert werden [204]. In der Frühphase der akuten Abstoßung zeigte sich hier in diesem Modell eine fast 50 %ige jedoch nicht signifikante Verminderung von Akt. Ob dieses die größere Menge an apoptotischen Zellen im Vergleich zu nativen Herzen an Tag 1 erklären kann, ist nicht klar. In hepatischen Gewebe einer anderen Arbeitsgruppe zeigte die Aktivierung von Akt einen reduzierten Ischämie / Reperfusionsschaden, jedoch keine Reduzierung des apoptotischen Zelltodes [205]. Im Verlauf der Transplantatabstoßung kam es in diesem hier verwendeten Modell zu einem weiteren Konzentrationsverlust an Akt mit gleichzeitiger Zunahme der apoptotischen Zellzahl. Durch die geringe Konzentration an Akt verlieren die Kardiomyozyten möglicherweise einen protektiven Mechanismus, proapoptische Faktoren können nun ungehindert in Richtung programmierten Zelltod wirken.

Es gibt Hinweise darauf, dass Akt wahrscheinlich Mittelpunkt verschiedener apoptotischer Stimuli ist [204], die gehemmt oder gefördert werden (s. Abbildung

## Diskussion

6). Auf indirektem Wege hemmt Akt u. a. die Transkription von FasL und Bax. Des Weiteren fördert es die Aktivierung von Bcl-2 durch Hemmung von Bad und die Aktivierung von NF $\kappa$ B-Protein durch Stimulierung der I $\kappa$ B-Kinase (IKK). Die stimulierte IKK führt zur Trennung von NF $\kappa$ B und I $\kappa$ B. NF $\kappa$ B transloziert in den Nukleus und sorgt für die Transkription der von ihm regulierten Gene.

In dem hier gezeigten Modell kam es dagegen mit dem Verlust an Akt zu einer Abnahme von FasL. Das könnte ein Hinweis dafür sei, dass hier der Fas-FasL-Weg wahrscheinlich keine Rolle spielt. NF $\kappa$ B stieg in seiner Konzentration ohne messbare Veränderung von I $\kappa$ B- $\alpha$ . Mögliche Gründe dafür wurden bereits beschrieben. Eventuell wird NF $\kappa$ B ohne Stimulierung der IKK aktiviert, denn es konnten hier und in unserer Arbeitsgruppe verschiedene NF $\kappa$ B-regulierte Gene vermehrt nachgewiesen werden. Möglicherweise kam es über eine transkriptionelle Hochregulierung von p53 [206] zur Zunahme an Bax-Protein, Bcl-2 wurde eventuell durch das ungehinderte Wirken von Bad gehemmt, daraufhin stieg die Rate der apoptotischen Zellen. Zur Klärung dieser komplizierten Regulationsmechanismen sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich.

### 5 Zusammenfassung und Ausblick

Seit der ersten Herztransplantation 1967 wurden zahlreiche Fortschritte in der Früherkennung von Abstoßung und der medikamentösen Immunsuppression erzielt. Die Abstoßung bleibt jedoch weiterhin eine häufige Ursache für die Mortalität und den Organverlust nach Herztransplantation. Durch Analyse verschiedener, apoptose-regulierender Proteine in dem hier verwendeten heterotopen und allogenen Modell (Wistar-Furth zu Lewis) sollte der Ablauf der akuten Abstoßung in transplantierten Rattenherzen nachvollzogen werden. Apoptose läßt sich in diesem Modell in zunehmender Anzahl im Früh-, Intermediär und Spätstadium nachweisen. Der programmierte Zelltod ist Ursache des fortschreitenden Parenchymschadens (Apoptose konnte in jedem 15. Kardiomyozyten nachgewiesen werden) und führt vermutlich letztendlich zum vollständigen Verlust der Myokardfunktion. Histologisch kommt es zu einer progredienten Zellinfiltration, zu ödematöser Schwellung und zum Myozytenuntergang. Während der Abstoßungsprozedur kann bei verschiedenen apoptose-regulierenden Proteinen eine Konzentrationsänderung gemessen werden. Das komplexe Zusammenspiel dieser Eiweiße leitet vermutlich den programmierten Zelltod ein, sowohl in den Kardiomyozyten wie auch in den gewebsinfiltrierenden Immunzellen. Während der akuten Transplantatabstoßung in diesem Modell steigt der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B in seiner Konzentration und Aktivität, jedoch ohne messbare Veränderung von I $\kappa$ B- $\alpha$ . Die Aktivitätszunahme von NF $\kappa$ B ist möglicherweise erkennbar an einer Zytokin-, Bax- und iNOS-Zunahme. Als Folge der vermehrten iNOS-Produktion wird vermutlich mehr NO freigesetzt, das wahrscheinlich zur Apoptoseinduktion in verschiedenen Zellen beiträgt. Die Zytokine führen zur vermehrten zellulären Infiltration in das Transplantat, während dessen das proapoptotische Protein Bax die Aktivierung von Caspase 3 einleitet. Aktivierte Caspase 3 nimmt an Tag 6 (am Endpunkt verschiedener Apoptoseinduktionswege) an Konzentration zu und stimuliert seinerseits verschiedene Substrate, die für die morphologischen Veränderungen des Zelltodes verantwortlich sind. Eventuell sorgt Caspase 3 auch für die Spaltung des apoptosehemmenden Proteins Bcl-2 in ein kleineres Molekül

## Zusammenfassung und Ausblick

(posttranskriptionelle Degradation) und beeinflusst dadurch das Verhältnis des proapoptischen Proteins Bax zu seinem Gegenspieler Bcl-2 zu Gunsten von Bax. Akt verliert in diesen Versuchen an Konzentration, dadurch vermindert sich möglicherweise sein hemmender Einfluss auf die proapoptisch wirkenden Proteine Bax und Bad. Akt soll jedoch auch hemmend auf FasL einwirken und dieses seinerseits Apoptose induzieren können. Jedoch läuft die Induktion von Apoptose der Kardiomyozyten in diesem Modell vermutlich nicht über FasL. Obwohl Apoptose in diesem Modell zunimmt, kommt es zu einem Verlust an FasL. Das Fas-FasL-System könnte hier ein protektiver Mechanismus für die Kardiomyozyten sein, z.B. die Zellen gegen das Empfängerimmunsystem schützen, oder im Rahmen einer Entzündungsreaktion herunterreguliert werden. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass FasL in ein kleineres Molekül gespalten wird, das im Sinne eines Chemokines wirkt.

Die Hemmung apoptoseinduzierender Mechanismen ist ein neuer möglicher Ansatz zur Verbesserung des Langzeitüberlebens von kardialen Transplantaten. Tiermodelle wie dieses scheinen geeignet, das Verständnis der komplizierten, biochemischen Abläufe zu vertiefen. Auf diesem Wege könnte es gelingen, eine vereinfachte und spezifische Fühldiagnostik sowie eine pharmakologische Prävention zu entwickeln, die in die Abstoßungskette eingreift. Dieser Ausblick bleibt weiteren Recherchen vorbehalten.

## 6 Summary

Since the first human heart transplantation in 1967 much progress has been made in early diagnosis of rejection and immunosuppression. Rejection, however, remains a frequent cause of mortality and transplant loss after heart transplantation. Through analysis of diverse apoptose-regulating proteins in heterotopic and allogeneic model (Wistar-Furth to Lewis) used here, acute rejection of transplanted rat-hearts was examined. Herein Apoptosis can be detected in increasing number during early, intermediary and late stages of rejection. Programmed cell death is a mediator of graft destruction (apoptosis can be found in every 15<sup>th</sup> cardiomyocyte) and is assumed to lead, ultimately, to the loss of transplant function. The transplanted graft shows histologically progressive cell-infiltration, tissue-oedema and destruction (death) of cardiomyocytes. During acute rejection an alteration in the concentration of certain apoptosis-regulating proteins can be measured. The complex interplay of these proteins is probably responsible for programmed cell death in graft-infiltrating cells as well as in cardiomyocytes. In this model the transcription factor NF $\kappa$ B rises in concentration and activation during acute rejection, but without a measurable change of I $\kappa$ B- $\alpha$ . The increased activity of NF $\kappa$ B is probably noticeable in an increase of cytokines, bax and iNOS. As a result of a progressive iNOS-production you can find a release of NO, which supposedly contribute to the induction of apoptosis in various cells. The cytokines lead to a progressive cell infiltration in the transplanted organ, while bax triggers the activation of caspase 3. Activated caspase 3 increases in concentration on day six after transplantation (at the end point of many apoptosis-induction ways) and stimulates on his part diverse substrates which are responsible for morphological changes during apoptotic cell death. Caspase 3 probably contributes to cleavage of bcl-2 into a smallish molecule (posttranscriptional degradation) and influences the proportion of proapoptotic bax to its antagonist bcl-2 in favour of bax. Akt loses concentration during these experiments; and this possibly leads to the reduction of its inhibitory effect on the proapoptotic bax and bad. It is also supposed that Akt inhibits FasL and that this can induce apoptosis on its part. In this model, however, the

## Summary

induction of apoptosis of the cardiomyocytes is probably independent of FasL. Although apoptosis increases in this model, there is a decline in FasL. It is possible that Fas-FasL acts as a protective mechanism for the cardiomyocytes, by protecting the cells from host immune cells for example, or that it can be down-regulated within an inflammation. Another possibility is that FasL cleaves in a smallish molecule which functions as a chemokine.

The impact on apoptosis-inducing metabolism could be a new diagnostic and therapeutic approach in the management of rejection after cardiac transplantation. In vitro models like this seem to be helpful for a further research. In this regard the comparison with human conditions should be confirmed. On the basis of a more profound knowledge of the complex biochemical interactions a more simple and specific early diagnosis, an improved and expanded selection of heart donors and the development of protecting agents are imaginable.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Taylor, D.O., et al., *Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-third official adult heart transplantation report--2006*. J Heart Lung Transplant, 2006. **25**(8): p. 869-79.
2. Murray, J.E., *The first successful organ transplants in man*. J Am Coll Surg, 2005. **200**(1): p. 5-9.
3. Cooper, D.K., *Christiaan Barnard and his contributions to heart transplantation*. J Heart Lung Transplant, 2001. **20**(6): p. 599-610.
4. Mason, D.W. and P.J. Morris, *Effector mechanisms in allograft rejection*. Annu Rev Immunol, 1986. **4**: p. 119-45.
5. Caves, P.K., et al., *Diagnosis of human cardiac allograft rejection by serial cardiac biopsy*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1973. **66**(3): p. 461-6.
6. Cotts, W.G. and M.R. Johnson, *The challenge of rejection and cardiac allograft vasculopathy*. Heart Fail Rev, 2001. **6**(3): p. 227-40.
7. Deng, M.C., *Cardiac transplantation*. Heart, 2002. **87**(2): p. 177-84.
8. Dharnidharka, V.R., D.M. Stablein, and W.E. Harmon, *Post-transplant infections now exceed acute rejection as cause for hospitalization: a report of the NAPRTCS*. Am J Transplant, 2004. **4**(3): p. 384-9.
9. Fishman, J.A. and R.H. Rubin, *Infection in organ-transplant recipients*. N Engl J Med, 1998. **338**(24): p. 1741-51.
10. Bernabeu-Wittel, M., et al., *Infections in renal transplant recipients receiving mycophenolate versus azathioprine-based immunosuppression*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2002. **21**(3): p. 173-80.
11. Fingerhuth, H., et al., *3-Deazaadenosine prevents leukocyte invasion by suppression of adhesion molecule expression during acute cardiac allograft rejection: involvement of apoptotic cell death*. J Heart Lung Transplant, 2004. **23**(8): p. 970-8.
12. Koglin, J. and M.E. Russell, *Alloimmune-mediated apoptosis: comparison in mouse models of acute and chronic cardiac rejection*. Transplantation, 1999. **67**(6): p. 904-9.
13. Shi, C., et al., *Immunologic basis of transplant-associated arteriosclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(9): p. 4051-6.
14. Russell, P.S., et al., *Coronary atherosclerosis in transplanted mouse hearts. II. Importance of humoral immunity*. J Immunol, 1994. **152**(10): p. 5135-41.
15. Weis, M. and W. von Scheidt, *Cardiac allograft vasculopathy: a review*. Circulation, 1997. **96**(6): p. 2069-77.
16. Orbaek Andersen, H., *Heart allograft vascular disease: an obliterative vascular disease in transplanted hearts*. Atherosclerosis, 1999. **142**(2): p. 243-63.
17. Gao, S.Z., et al., *Acute myocardial infarction in cardiac transplant recipients*. Am J Cardiol, 1989. **64**(18): p. 1093-7.
18. Stadlbauer, T.H. and J.W. Kupiec-Weglinski, *Immunobiology of sensitization in transplant recipients*. Am J Med Sci, 1997. **313**(5): p. 268-74.



19. Taylor, D.O., et al., *The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-first official adult heart transplant report--2004*. J Heart Lung Transplant, 2004. **23**(7): p. 796-803.
20. Cook, D.J., E.S. Bishay, and M. Yamani, *The use and misuse of immunologic monitoring after transplantation: approaches that have proved useful*. Curr Opin Cardiol, 2000. **15**(2): p. 104-7.
21. Sharples, L.D., et al., *Risk factor analysis for the major hazards following heart transplantation--rejection, infection, and coronary occlusive disease*. Transplantation, 1991. **52**(2): p. 244-52.
22. Reichart, B., et al., *European Multicenter Tacrolimus (FK506) Heart Pilot Study: one-year results--European Tacrolimus Multicenter Heart Study Group*. J Heart Lung Transplant, 1998. **17**(8): p. 775-81.
23. Almond, P.S., et al., *Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients*. Transplantation, 1993. **55**(4): p. 752-6; discussion 756-7.
24. Uretsky, B.F., et al., *Development of coronary artery disease in cardiac transplant patients receiving immunosuppressive therapy with cyclosporine and prednisone*. Circulation, 1987. **76**(4): p. 827-34.
25. Tilney, N.L. and J.W. Kupiec-Weglinski, *The biology of acute transplant rejection*. Ann Surg, 1991. **214**(2): p. 98-106.
26. Billingham, M.E., et al., *A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: Heart Rejection Study Group. The International Society for Heart Transplantation*. J Heart Transplant, 1990. **9**(6): p. 587-93.
27. Stewart, S., et al., *Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection*. J Heart Lung Transplant, 2005. **24**(11): p. 1710-20.
28. Pattison, J.M. and A.M. Krensky, *New insights into mechanisms of allograft rejection*. Am J Med Sci, 1997. **313**(5): p. 257-63.
29. Chiffolleau, E., P.T. Walsh, and L. Turka, *Apoptosis and transplantation tolerance*. Immunol Rev, 2003. **193**: p. 124-45.
30. Bhalodolia, R., et al., *Fulminant acute cellular rejection with negative findings on endomyocardial biopsy*. J Heart Lung Transplant, 2006. **25**(8): p. 989-92.
31. Gomez, L., et al., *Link between immune cell infiltration and mitochondria-induced cardiomyocyte death during acute cardiac graft rejection*. Am J Transplant, 2006. **6**(3): p. 487-95.
32. Khan, S., et al., *Rapamycin confers preconditioning-like protection against ischemia-reperfusion injury in isolated mouse heart and cardiomyocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2006. **41**(2): p. 256-64.
33. Liu, Y., et al., *Effects of inhibition of poly(adenosine diphosphate-ribose) synthase on acute cardiac allograft rejection*. Transplantation, 2004. **78**(5): p. 668-74.
34. Steller, H., *Mechanisms and genes of cellular suicide*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1445-9.
35. Wyllie, A.H., J.F. Kerr, and A.R. Currie, *Cell death: the significance of apoptosis*. Int Rev Cytol, 1980. **68**: p. 251-306.
36. Arends, M.J. and A.H. Wyllie, *Apoptosis: mechanisms and roles in pathology*. Int Rev Exp Pathol, 1991. **32**: p. 223-54.

37. Kroemer, G., B. Dallaporta, and M. Resche-Rigon, *The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis*. Annu Rev Physiol, 1998. **60**: p. 619-42.
38. Majno, G. and I. Joris, *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 3-15.
39. Flotats, A. and I. Carrio, *Non-invasive in vivo imaging of myocardial apoptosis and necrosis*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2003. **30**(4): p. 615-30.
40. Gill, C., R. Mestril, and A. Samali, *Losing heart: the role of apoptosis in heart disease--a novel therapeutic target?* Faseb J, 2002. **16**(2): p. 135-46.
41. Kerr, J.F., C.M. Winterford, and B.V. Harmon, *Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy*. Cancer, 1994. **73**(8): p. 2013-26.
42. Samali, A., A.M. Gorman, and T.G. Cotter, *Apoptosis -- the story so far*. Experientia, 1996. **52**(10-11): p. 933-41.
43. Matsumura, H., et al., *Necrotic death pathway in Fas receptor signaling*. J Cell Biol, 2000. **151**(6): p. 1247-56.
44. Wyllie, A.H., *Apoptosis: an overview*. Br Med Bull, 1997. **53**(3): p. 451-65.
45. Webb, S.J., D.J. Harrison, and A.H. Wyllie, *Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease*. Adv Pharmacol, 1997. **41**: p. 1-34.
46. Howie, S.E., D.J. Harrison, and A.H. Wyllie, *Lymphocyte apoptosis--mechanisms and implications in disease*. Immunol Rev, 1994. **142**: p. 141-56.
47. Reed, J.C., *Mechanisms of apoptosis*. Am J Pathol, 2000. **157**(5): p. 1415-30.
48. Hart, S.P., C. Haslett, and I. Dransfield, *Recognition of apoptotic cells by phagocytes*. Experientia, 1996. **52**(10-11): p. 950-6.
49. Cummings, M.C., C.M. Winterford, and N.I. Walker, *Apoptosis*. Am J Surg Pathol, 1997. **21**(1): p. 88-101.
50. Martin, S.J., D.R. Green, and T.G. Cotter, *Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery*. Trends Biochem Sci, 1994. **19**(1): p. 26-30.
51. Kaufmann, S.H. and M.O. Hengartner, *Programmed cell death: alive and well in the new millennium*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(12): p. 526-34.
52. Adams, J.M. and S. Cory, *Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(1): p. 61-6.
53. Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann, *Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 383-424.
54. Cheng, E.H., et al., *Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases*. Science, 1997. **278**(5345): p. 1966-8.
55. Kothakota, S., et al., *Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis*. Science, 1997. **278**(5336): p. 294-8.
56. Rudel, T. and G.M. Bokoch, *Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2*. Science, 1997. **276**(5318): p. 1571-4.
57. Wen, L.P., et al., *Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis*. J Biol Chem, 1997. **272**(41): p. 26056-61.

58. Enari, M., et al., *A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 43-50.
59. McDonnell, T.J., et al., *Importance of the Bcl-2 family in cell death regulation*. Experientia, 1996. **52**(10-11): p. 1008-17.
60. Yang, E. and S.J. Korsmeyer, *Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death*. Blood, 1996. **88**(2): p. 386-401.
61. Gross, A., J.M. McDonnell, and S.J. Korsmeyer, *BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis*. Genes Dev, 1999. **13**(15): p. 1899-911.
62. Nagata, S., *Fas ligand-induced apoptosis*. Annu Rev Genet, 1999. **33**: p. 29-55.
63. Krueger, A., et al., *The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis*. Immunol Rev, 2003. **193**: p. 58-69.
64. Tanaka, M., et al., *Downregulation of Fas ligand by shedding*. Nat Med, 1998. **4**(1): p. 31-6.
65. Burgering, B.M. and R.H. Medema, *Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(6): p. 689-701.
66. Igney, F.H. and P.H. Krammer, *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(4): p. 277-88.
67. Scaffidi, C., et al., *Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways*. Embo J, 1998. **17**(6): p. 1675-87.
68. Li, H., et al., *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis*. Cell, 1998. **94**(4): p. 491-501.
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. 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.
71. Brazil, D.P. and B.A. Hemmings, *Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(11): p. 657-64.
72. Brunet, A., S.R. Datta, and M.E. Greenberg, *Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway*. Curr Opin Neurobiol, 2001. **11**(3): p. 297-305.
73. Wu, J.T. and J.G. Kral, *The NF-kappaB/IkappaB signaling system: a molecular target in breast cancer therapy*. J Surg Res, 2005. **123**(1): p. 158-69.
74. Mustapha, S., et al., *A direct requirement of nuclear factor-kappa B for suppression of apoptosis in ventricular myocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **279**(3): p. H939-45.
75. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 225-60.
76. Nathan, C. and Q.W. Xie, *Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls*. Cell, 1994. **78**(6): p. 915-8.
77. Ursell, P.C. and M. Mayes, *Anatomic distribution of nitric oxide synthase in the heart*. Int J Cardiol, 1995. **50**(3): p. 217-23.
78. Muhl, H., et al., *Nitric oxide donors induce apoptosis in glomerular mesangial cells, epithelial cells and endothelial cells*. Eur J Pharmacol, 1996. **317**(1): p. 137-49.

79. Severa, M., et al., *Inhibition of interleukin-12 expression in diltiazem-treated dendritic cells through the reduction of nuclear factor-kappa B transcriptional activity*. *Biochem Pharmacol*, 2005. **69**(3): p. 425-32.
80. Kuhnel, F., et al., *NFkappaB mediates apoptosis through transcriptional activation of Fas (CD95) in adenoviral hepatitis*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(9): p. 6421-7.
81. Matsui, K., et al., *Identification of two NF-kappa B sites in mouse CD95 ligand (Fas ligand) promoter: functional analysis in T cell hybridoma*. *J Immunol*, 1998. **161**(7): p. 3469-73.
82. Nicholson, D.W. and N.A. Thornberry, *Caspases: killer proteases*. *Trends Biochem Sci*, 1997. **22**(8): p. 299-306.
83. Cryns, V. and J. Yuan, *Proteases to die for*. *Genes Dev*, 1998. **12**(11): p. 1551-70.
84. Lakhani, S. and R.A. Flavell, *Caspases and T lymphocytes: a flip of the coin?* *Immunol Rev*, 2003. **193**: p. 22-30.
85. Creagh, E.M., H. Conroy, and S.J. Martin, *Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity*. *Immunol Rev*, 2003. **193**: p. 10-21.
86. Li, Y. and R. Cohen, *Caspase inhibitors and myocardial apoptosis*. *Int Anesthesiol Clin*, 2005. **43**(2): p. 77-89.
87. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. *Nature*, 2000. **407**(6805): p. 770-6.
88. Adams, J.M. and S. Cory, *The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival*. *Science*, 1998. **281**(5381): p. 1322-6.
89. Zou, H., et al., *An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(17): p. 11549-56.
90. White, E., *Life, death, and the pursuit of apoptosis*. *Genes Dev*, 1996. **10**(1): p. 1-15.
91. Krajewski, S., et al., *Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes*. *Cancer Res*, 1993. **53**(19): p. 4701-14.
92. Rosse, T., et al., *Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c*. *Nature*, 1998. **391**(6666): p. 496-9.
93. Antonsson, B., et al., *Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2*. *Science*, 1997. **277**(5324): p. 370-2.
94. Zong, W.X., et al., *Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis*. *J Cell Biol*, 2003. **162**(1): p. 59-69.
95. Hsu, Y.T., K.G. Wolter, and R.J. Youle, *Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(8): p. 3668-72.
96. Gross, A., et al., *Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis*. *Embo J*, 1998. **17**(14): p. 3878-85.
97. Desagher, S., et al., *Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis*. *J Cell Biol*, 1999. **144**(5): p. 891-901.

98. 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.
99. Wyllie, A.H. and P. Golstein, *More than one way to go*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(1): p. 11-3.
100. Suda, T., et al., *Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family*. Cell, 1993. **75**(6): p. 1169-78.
101. Baker, S.J. and E.P. Reddy, *Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily*. Oncogene, 1998. **17**(25): p. 3261-70.
102. Kasibhatla, S., L. Genestier, and D.R. Green, *Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 987-92.
103. Xerri, L., et al., *Fas ligand is not only expressed in immune privileged human organs but is also coexpressed with Fas in various epithelial tissues*. Mol Pathol, 1997. **50**(2): p. 87-91.
104. Kiener, P.A., et al., *Differential induction of apoptosis by Fas-Fas ligand interactions in human monocytes and macrophages*. J Exp Med, 1997. **185**(8): p. 1511-6.
105. Griffith, T.S., et al., *Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege*. Science, 1995. **270**(5239): p. 1189-92.
106. Hahne, M., et al., *Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape*. Science, 1996. **274**(5291): p. 1363-6.
107. Scholz, M. and J. Cinatl, *Fas/FasL interaction: a novel immune therapy approach with immobilized biologicals*. Med Res Rev, 2005. **25**(3): p. 331-42.
108. Song, G., G. Ouyang, and S. Bao, *The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival*. J Cell Mol Med, 2005. **9**(1): p. 59-71.
109. Matsui, T. and A. Rosenzweig, *Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI 3-kinase and Akt*. J Mol Cell Cardiol, 2005. **38**(1): p. 63-71.
110. Cardone, M.H., et al., *Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation*. Science, 1998. **282**(5392): p. 1318-21.
111. Kane, L.P., et al., *Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase*. Curr Biol, 1999. **9**(11): p. 601-4.
112. Sen, R. and D. Baltimore, *Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences*. Cell, 1986. **46**(5): p. 705-16.
113. Baldwin, A.S., Jr., *The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 649-83.
114. Loscalzo, J. and G. Welch, *Nitric oxide and its role in the cardiovascular system*. Prog Cardiovasc Dis, 1995. **38**(2): p. 87-104.
115. 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.
116. Worrall, N.K., et al., *Modulation of in vivo alloreactivity by inhibition of inducible nitric oxide synthase*. J Exp Med, 1995. **181**(1): p. 63-70.

117. Tian, B., et al., *Mechanisms of cytokine induced NO-mediated cardiac fibroblast apoptosis*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(5): p. H1958-67.
118. Ito, H., et al., *Apoptosis in the human allografted kidney. Analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated DUTP-biotin nick end labeling*. Transplantation, 1995. **60**(8): p. 794-8.
119. Kageyama, Y., et al., *Apoptosis is involved in acute cardiac allograft rejection in rats*. Ann Thorac Surg, 1998. **65**(6): p. 1604-9.
120. Krams, S.M., et al., *Apoptosis as a mechanism of cell death in liver allograft rejection*. Transplantation, 1995. **59**(4): p. 621-5.
121. Ono, K. and E.S. Lindsey, *Improved technique of heart transplantation in rats*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1969. **57**(2): p. 225-9.
122. Schmid, C., et al., *Successful heterotopic heart transplantation in rat*. Microsurgery, 1994. **15**(4): p. 279-81.
123. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
124. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
125. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
126. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
127. Grandel, U., et al., *Endotoxin-induced myocardial tumor necrosis factor- $\alpha$  synthesis depresses contractility of isolated rat hearts: evidence for a role of sphingosine and cyclooxygenase-2-derived thromboxane production*. Circulation, 2000. **102**(22): p. 2758-64.
128. Grunenfelder, J., et al., *Up-regulation of Bcl-2 through hyperbaric pressure transfection of TGF- $\beta$ 1 ameliorates ischemia-reperfusion injury in rat cardiac allografts*. J Heart Lung Transplant, 2002. **21**(2): p. 244-50.
129. Tullius, S.G. and N.L. Tilney, *Both alloantigen-dependent and -independent factors influence chronic allograft rejection*. Transplantation, 1995. **59**(3): p. 313-8.
130. Adams, D.H., et al., *Experimental graft arteriosclerosis. I. The Lewis-to-F-344 allograft model*. Transplantation, 1992. **53**(5): p. 1115-9.
131. Oberbauer, R., et al., *Regulation of renal tubular cell apoptosis and proliferation after ischemic injury to a solitary kidney*. J Lab Clin Med, 2001. **138**(5): p. 343-51.
132. Aukrust, P., L. Gullestad, and S.S. Froland, *Is apoptosis an important pathogenic factor in cardiovascular disease?* Eur J Clin Invest, 1999. **29**(5): p. 369-71.
133. Olivetti, G., et al., *Apoptosis in the failing human heart*. N Engl J Med, 1997. **336**(16): p. 1131-41.
134. Saraste, A., et al., *Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation*. Eur J Clin Invest, 1999. **29**(5): p. 380-6.

135. Raisky, O., et al., *Mitochondrial permeability transition in cardiomyocyte apoptosis during acute graft rejection*. Am J Transplant, 2004. **4**(7): p. 1071-8.
136. Van Hoffen, E., et al., *T cell apoptosis in human heart allografts: association with lack of co-stimulation?* Am J Pathol, 1998. **153**(6): p. 1813-24.
137. Rodriguez, M. and J. Schaper, *Apoptosis: measurement and technical issues*. J Mol Cell Cardiol, 2005. **38**(1): p. 15-20.
138. Josien, R., et al., *Fas ligand, tumor necrosis factor-alpha expression, and apoptosis during allograft rejection and tolerance*. Transplantation, 1998. **66**(7): p. 887-93.
139. Ke, B., et al., *Fas ligand gene transfer prolongs rat renal allograft survival and down-regulates anti-apoptotic Bag-1 in parallel with enhanced Th2-type cytokine expression*. Transplantation, 2000. **69**(8): p. 1690-4.
140. Swenson, K.M., et al., *Fas ligand gene transfer to renal allografts in rats: effects on allograft survival*. Transplantation, 1998. **65**(2): p. 155-60.
141. Kown, M.H., et al., *Bcl-2-mediated inhibition of apoptosis in rat cardiac allografts worsens development of graft coronary artery disease*. J Heart Lung Transplant, 2003. **22**(9): p. 986-92.
142. Jollow, K.C., et al., *Apoptosis of mononuclear cell infiltrates in cardiac allograft biopsy specimens questions studies of biopsy-cultured cells*. Transplantation, 1997. **63**(10): p. 1482-9.
143. Junqueira and Carneiro, *Histologie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1996. **4. Auflage**.
144. Szabolcs, M., et al., *Apoptosis of cardiac myocytes during cardiac allograft rejection. Relation to induction of nitric oxide synthase*. Circulation, 1996. **94**(7): p. 1665-73.
145. Szabolcs, M.J., et al., *Apoptosis and increased expression of inducible nitric oxide synthase in human allograft rejection*. Transplantation, 1998. **65**(6): p. 804-12.
146. Laguens, R.P., et al., *Identification of programmed cell death (apoptosis) in situ by means of specific labeling of nuclear DNA fragments in heart biopsy samples during acute rejection episodes*. J Heart Lung Transplant, 1996. **15**(9): p. 911-8.
147. Koglin, J., et al., *Attenuated acute cardiac rejection in NOS2 -/- recipients correlates with reduced apoptosis*. Circulation, 1999. **99**(6): p. 836-42.
148. Yin, H., L. Chao, and J. Chao, *Kallikrein/kinin protects against myocardial apoptosis after ischemia/reperfusion via Akt-glycogen synthase kinase-3 and Akt-Bad.14-3-3 signaling pathways*. J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 8022-30.
149. Bergese, S.D., et al., *Apoptosis in murine cardiac grafts*. Transplantation, 1997. **63**(2): p. 320-5.
150. Feeley, B.T., et al., *Nuclear factor-kappaB transcription factor decoy treatment inhibits graft coronary artery disease after cardiac transplantation in rodents*. Transplantation, 2000. **70**(11): p. 1560-8.
151. Masri, S.C., et al., *Sustained apoptosis in human cardiac allografts despite histologic resolution of rejection*. Transplantation, 2003. **76**(5): p. 859-64.

152. Chandrasekar, B. and G.L. Freeman, *Induction of nuclear factor kappaB and activation protein 1 in postischemic myocardium*. FEBS Lett, 1997. **401**(1): p. 30-4.
153. Xie, Q.W., Y. Kashiwabara, and C. Nathan, *Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase*. J Biol Chem, 1994. **269**(7): p. 4705-8.
154. Cooper, M., et al., *Myocardial nuclear factor-kappaB activity and nitric oxide production in rejecting cardiac allografts*. Transplantation, 1998. **66**(7): p. 838-44.
155. Yang, X., et al., *Induction of myocardial nitric oxide synthase by cardiac allograft rejection*. J Clin Invest, 1994. **94**(2): p. 714-21.
156. Stadlbauer, T.H.e.a., *Kinetik der immunologischen Mediatoren bei der akuten Transplantatabstoßung*. Zeitung für Kardiologie, 2005. **94**(Supplement 1): p. 742.
157. Pieper, G.M., et al., *Mechanisms of the protective action of diethyldithiocarbamate-iron complex on acute cardiac allograft rejection*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(5): p. H1542-51.
158. Pinsky, D.J., et al., *The lethal effects of cytokine-induced nitric oxide on cardiac myocytes are blocked by nitric oxide synthase antagonism or transforming growth factor beta*. J Clin Invest, 1995. **95**(2): p. 677-85.
159. Mannick, J.B., X.Q. Miao, and J.S. Stamler, *Nitric oxide inhibits Fas-induced apoptosis*. J Biol Chem, 1997. **272**(39): p. 24125-8.
160. Csizmadia, V., et al., *Differential NF-kappaB and IkappaB gene expression during development of cardiac allograft rejection versus CD154 monoclonal antibody-induced tolerance*. Transplantation, 2001. **71**(7): p. 835-40.
161. Lee, J.R., et al., *Expression of NF-kappaB and cytokines in chronic rejection of transplanted murine heart*. J Korean Med Sci, 2001. **16**(4): p. 397-406.
162. Wang, C.Y., M.W. Mayo, and A.S. Baldwin, Jr., *TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB*. Science, 1996. **274**(5288): p. 784-7.
163. Kim, J.M., et al., *Helicobacter pylori infection activates NF-kappaB signaling pathway to induce iNOS and protect human gastric epithelial cells from apoptosis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **285**(6): p. G1171-80.
164. Poppelmann, B., et al., *NF{kappa}B-dependent down-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated proteins contributes to interleukin-1-mediated enhancement of ultraviolet B-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2005. **280**(16): p. 15635-43.
165. Finn, P.W., et al., *Inhibition of NF-kappaB-dependent T cell activation abrogates acute allograft rejection*. J Immunol, 2001. **167**(10): p. 5994-6001.
166. Grimm, S., et al., *Bcl-2 down-regulates the activity of transcription factor NF-kappaB induced upon apoptosis*. J Cell Biol, 1996. **134**(1): p. 13-23.
167. Kaltschmidt, B., et al., *The pro- or anti-apoptotic function of NF-kappaB is determined by the nature of the apoptotic stimulus*. Eur J Biochem, 2000. **267**(12): p. 3828-35.



168. May, M.J. and S. Ghosh, *Signal transduction through NF-kappa B*. Immunol Today, 1998. **19**(2): p. 80-8.
169. Tu, Z., et al., *I kappa B kinase is critical for TNF-alpha-induced VCAM1 gene expression in renal tubular epithelial cells*. J Immunol, 2001. **166**(11): p. 6839-46.
170. Zwacka, R.M., et al., *Ischemia/reperfusion injury in the liver of BALB/c mice activates AP-1 and nuclear factor kappaB independently of IkappaB degradation*. Hepatology, 1998. **28**(4): p. 1022-30.
171. Condorelli, G., et al., *Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and bcl-2 during left ventricular adaptations to chronic pressure overload in the rat*. Circulation, 1999. **99**(23): p. 3071-8.
172. Shintaku, S., et al., *Expression of bcl-2 homologue mRNAs in rat liver allograft: rejection-induced cell apoptosis is associated with upregulation of bax and bcl-xs expression*. Transpl Int, 1998. **11 Suppl 1**: p. S284-8.
173. Han, D.J., et al., *Diversity of gene expression following heart transplantation in rats*. Transplant Proc, 1998. **30**(7): p. 3405-6.
174. Grunenfelder, J., et al., *Upregulation of Bcl-2 through caspase-3 inhibition ameliorates ischemia/reperfusion injury in rat cardiac allografts*. Circulation, 2001. **104**(12 Suppl 1): p. I202-6.
175. Chiang-Ting, C., et al., *Adenovirus-mediated bcl-2 gene transfer inhibits renal ischemia/reperfusion induced tubular oxidative stress and apoptosis*. Am J Transplant, 2005. **5**(6): p. 1194-203.
176. Yamamoto, H., et al., *Expression of Bcl-2/Bax mRNA in grafted liver during acute rejection after rat liver transplantation*. Transplant Proc, 1998. **30**(7): p. 2950-1.
177. Zheng, L., et al., *Cytoprotection of human umbilical vein endothelial cells against apoptosis and CTL-mediated lysis provided by caspase-resistant Bcl-2 without alterations in growth or activation responses*. J Immunol, 2000. **164**(9): p. 4665-71.
178. Yamamoto, H., et al., *Role of the bcl-2/bax pathway in hepatocyte apoptosis during acute rejection after rat liver transplantation*. Transpl Int, 1998. **11 Suppl 1**: p. S179-84.
179. Castaneda, M.P., et al., *Activation of mitochondrial apoptotic pathways in human renal allografts after ischemiareperfusion injury*. Transplantation, 2003. **76**(1): p. 50-4.
180. Ke, Y.S., et al., *Effects of antidigoxin antiserum on endoxin levels, apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 protein in ischaemia-reperfusion myocardium*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2004. **31**(10): p. 691-5.
181. Zech, B., et al., *Mass spectrometric analysis of nitric oxide-modified caspase-3*. J Biol Chem, 1999. **274**(30): p. 20931-6.
182. Mueller, T.H., et al., *Caspase 3 inhibition improves survival and reduces early graft injury after ischemia and reperfusion in rat liver transplantation*. Transplantation, 2004. **78**(9): p. 1267-73.
183. Quadri, S.M., et al., *Caspase inhibition improves ischemia-reperfusion injury after lung transplantation*. Am J Transplant, 2005. **5**(2): p. 292-9.

184. Nakano, M., et al., *Caspase-3 inhibitor prevents apoptosis of human islets immediately after isolation and improves islet graft function*. *Pancreas*, 2004. **29**(2): p. 104-9.
185. Azuara, D., et al., *Apoptosis inhibition plays a greater role than necrosis inhibition in decreasing bacterial translocation in experimental intestinal transplantation*. *Surgery*, 2005. **137**(1): p. 85-91.
186. Porter, C.J., J.E. Ronan, and M.J. Cassidy, *fas-fas-ligand antigen expression and its relationship to increased apoptosis in acute renal transplant rejection*. *Transplantation*, 2000. **69**(6): p. 1091-4.
187. Shulzhenko, N., et al., *Intragraft activation of genes encoding cytotoxic T lymphocyte effector molecules precedes the histological evidence of rejection in human cardiac transplantation*. *Transplantation*, 2001. **72**(10): p. 1705-8.
188. Hiroyasu, S., et al., *Analysis of the Fas system and Bcl-2 in rat liver allograft rejection*. *J Surg Res*, 1999. **84**(2): p. 204-11.
189. Matsuno, T., et al., *Expression of Fas/Fas ligand and apoptosis induction during renal allograft rejection*. *Transplant Proc*, 1998. **30**(7): p. 2947-9.
190. Larsen, C.P., et al., *Fas-mediated cytotoxicity. An immunoeffector or immunoregulatory pathway in T cell-mediated immune responses?* *Transplantation*, 1995. **60**(3): p. 221-4.
191. Oh, S.I., et al., *Correlation of Fas and Fas ligand expression with rejection status of transplanted heart in human*. *Transplantation*, 2001. **71**(7): p. 906-9.
192. Walsh, K. and M. Sata, *Negative regulation of inflammation by Fas ligand expression on the vascular endothelium*. *Trends Cardiovasc Med*, 1999. **9**(1-2): p. 34-41.
193. Seino, K., et al., *Chemotactic activity of soluble Fas ligand against phagocytes*. *J Immunol*, 1998. **161**(9): p. 4484-8.
194. Ottonello, L., et al., *Soluble Fas ligand is chemotactic for human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes*. *J Immunol*, 1999. **162**(6): p. 3601-6.
195. Lau, H.T., et al., *Prevention of islet allograft rejection with engineered myoblasts expressing FasL in mice*. *Science*, 1996. **273**(5271): p. 109-12.
196. Bellgrau, D., et al., *A role for CD95 ligand in preventing graft rejection*. *Nature*, 1995. **377**(6550): p. 630-2.
197. Allison, J., et al., *Transgenic expression of CD95 ligand on islet beta cells induces a granulocytic infiltration but does not confer immune privilege upon islet allografts*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(8): p. 3943-7.
198. Seino, K., et al., *Transplantation of CD95 ligand-expressing grafts: influence of transplantation site and difficulty in protecting allo- and xenografts*. *Transplantation*, 1997. **64**(7): p. 1050-4.
199. Song, E., et al., *Blocking CTL-based cytotoxic pathways reduces apoptosis of transplanted hepatocytes*. *J Surg Res*, 2001. **99**(1): p. 61-9.
200. Miwa, K., et al., *Caspase 1-independent IL-1beta release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand*. *Nat Med*, 1998. **4**(11): p. 1287-92.
201. Takeuchi, T., et al., *Accelerated rejection of Fas ligand-expressing heart grafts*. *J Immunol*, 1999. **162**(1): p. 518-22.

## Literaturverzeichnis

202. Zou, Y., et al., *Heat shock transcription factor 1 protects cardiomyocytes from ischemia/reperfusion injury*. *Circulation*, 2003. **108**(24): p. 3024-30.
203. 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.
204. 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.
205. Muller, C., et al., *Alpha-lipoic acid preconditioning reduces ischemia-reperfusion injury of the rat liver via the PI3-kinase/Akt pathway*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003. **285**(4): p. G769-78.
206. Wu, H. and G. Lozano, *NF-kappa B activation of p53. A potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(31): p. 20067-74.

## 8 Verzeichnisse

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

µl	mikroliter
A	Ampere
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AK	Antikörper
APAAP	Alkalische Phosphatase-antialkalische Phosphatase-Markierung
APAF-1	Apoptotische Proteasen aktivierender Faktor
BH-Domäne	Bcl-2-Homologie-Domäne
Bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin
cDNA	Komplementäre DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxyNucleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
dUTP	desoxyUraciltriphosphat
ECL	Enhanced-Chemiluminiszenzlösung
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fa.	Firma
FasL	Fas-Ligand
g	Gramm
HE	Hämalaun-Eosin
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IFN	Interferon
IL	Interleukin

## Verzeichnisse

iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
I $\kappa$ B	Inhibitor of Nuclear Factor $\kappa$ B
IKK	I $\kappa$ B-Kinase
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
l	Liter
LEW	Lewis-Rattenstamm
Lsg.	Lösung
MHC	Majorhistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
mM	Millimol
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NF $\kappa$ B	Nuclear Factor $\kappa$ B
nm	Nanometer
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
OD	Optische Dichte
PBGD	Porphobilinogen Deaminase
PBS	Phosphat gepuffertes Salin
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	decadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PVDF	polyvinylidene difluoride
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulphat
SDS-Page	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
Sek.	Sekunden

## Verzeichnisse

SEM	Standard error of the mean
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrom
TAE	Tris-acid EDTA
TBE	Tris/ Borsäure/ EDTA
TdT	Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
TNF	Tumornekrosefaktor
Trpf.	Tropfen
TUNEL	Terminale-Deoxynucleotidyl-Transferase-mediertes dUTP Nick-End-Labeling
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Verd.	Verdünnung
WCE-Puffer	White-Cell-Extraction-Puffer

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Morphologische Veränderungen von Apoptose und Nekrose .....	15
Abbildung 2: Elektronenmikroskopisches Bild von apoptotischen Zellen in verschiedenen Stadien .....	16
Abbildung 3: Gleichgewicht zwischen Bax und Bcl-2 .....	17
Abbildung 4: Mitochondrialer Weg zur Auslösung von Apoptose .....	18
Abbildung 5: Extrinsischer Apoptoseinduktionsweg .....	19
Abbildung 6: Die zellulären Effekte von Akt .....	20
Abbildung 7: NFκB-regulierte Gene .....	21
Abbildung 8: Transplantatabstoßung in Prozent .....	56
Abbildung 9: Elastika-Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	57
Abbildung 11: Nachweis von apoptotischen Zellen mittels TUNEL-Assay .....	60
Abbildung 12: TUNEL-Assay .....	60
Abbildung 13: Prozentualer Anteil der apoptotischen Kardiomyozyten an der Gesamtzahl der apoptotischen Zellen .....	61
Abbildung 14: Prozentualer Anteil der apoptotischen Kardiomyozyten an der Gesamtzahl der Kardiomyozyten .....	62
Abbildung 15: iNOS-Färbung .....	64
Abbildung 16: iNOS-Graphik .....	64
Abbildung 17: Bax .....	65
Abbildung 18: Bcl-2 .....	66
Abbildung 19: Bcl-2-PCR .....	67
Abbildung 20: FasL .....	68
Abbildung 21: Procaspase-3 .....	69
Abbildung 22: Aktive Caspase 3 .....	70
Abbildung 23: Akt .....	71
Abbildung 24: NFκB .....	72
Abbildung 25: IκB-α .....	73

### 8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Apoptose versus Nekrose.....	12
Tabelle 2: Palpationsscore.....	33
Tabelle 3: Lösungen für die Elastika-Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	35
Tabelle 4: Lösungen der Immunhistologie .....	36
Tabelle 5: Antikörper der Immunhistologie.....	37
Tabelle 6: Lösungen für den DNA-Leiter.....	39
Tabelle 7: Verwendete Lösungen .....	39
Tabelle 8: Lösungen für die Proteinisolierung.....	42
Tabelle 9: Lösungen für die Polyacrylamidgelelektrophorese .....	44
Tabelle 10: Lösungen für das Blotting.....	46
Tabelle 11: Lösungen für das Markieren der Blot-Membran und das Strippen ...	48
Tabelle 12: Primärantikörper zum Markieren der Blot-Membran.....	48
Tabelle 13: Zweitantikörper zum Markieren der Blot-Membran .....	49
Tabelle 14: RT-Mastermix für die Reverse Transkription.....	50
Tabelle 15: PCR-Mastermix .....	51
Tabelle 16: Primersequenzen und Produktgröße .....	52
Tabelle 17: Thermozyklerbedingungen .....	52
Tabelle 18: Lösungen für die Gelelektrophorese nach PCR .....	53



## 9 Wissenschaftliche Beiträge

Kreis, M.; Huber, P., Heidt, M., Schaub, M., Sayegh, M., Tillmanns, H., Stadlbauer, T.; *Apoptosis is an effector mechanism of acute cardiac allograft rejection: involvement of proteolytic Bcl-2 degradation*. Journal of heart and lung transplantation, in press

## 10 Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Tillmanns für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in der Medizinischen Klinik I (Kardiologie/Angiologie) am Zentrum für innere Medizin des Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH.

Prof. Dr. Hölschermann für die Überlassung des Themas, Betreuung der Arbeit und für die Bereitstellung von Mitteln zur Durchführung dieser Promotion.

Herrn Dr. Stadlbauer für die Betreuung, Unterstützung und die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.

Behnoush Parviz und Anne Staubitz für die Einführung in die Technik des Western Blot und der PCR.

Dr. Fingerhuth und Antje Weber für die Hilfestellungen in der Immunhistochemie.

Vielen Dank dem kardiologischen Labor für die freundliche und entspannte Atmosphäre und insbesondere Frau Parviz für die Unterstützung auch in schwierigen Situationen.

Meiner gesamten Familie möchte ich für die Aufmunterungen und das Verständnis danken. Meinen Eltern, „den Stützen“ in allen Lebenslagen, die mir alles ermöglicht haben und Rückhalt gaben, schulde ich besonderen Dank. Bei meinem Vater bedanke ich für mich noch für die Durchsicht der Arbeit und Kritik. Insbesondere danke ich meinem Mann Ingo für Anregung, Kritik und Aufmunterung bei Durchsicht der Arbeit, der mir in zahlreichen Situationen Hilfe leistet und mir den „Rücken freihält“. Ich danke dafür, dass es Euch alle gibt!

## 11 Lebenslauf

**Name:** Marion Kreis, geb. Ensslen

**Geburtsdatum:** 12.07.1973

**Geburtsort:** Bad Nauheim

**Familienstand:** verheiratet mit Dr. med. Ingo Kreis

**Eltern:** Dr. med. Roland Ensslen (Facharzt für Innere Medizin und Kardiologie)  
Helga Ensslen (Krankenschwester und Arzthelferin)

**Geschwister:** Dr. ing. Frank Ensslen (Bauingenieur)

**Ausbildung:** 1979-1983 Grundschule Bad Vilbel  
1983-1985 John-F.-Kennedy-Schule Bad Vilbel  
1985-1992 Georg-Büchner-Gymnasium Bad Vilbel  
1993-1995 Ausbildung zur Medizinisch-technischen Laborassistentin an der Justus-Liebig-Universität Gießen  
1998-2004 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Approbation:** 29.11.2004

**Berufliche Tätigkeit:** 1992-1993 Krankenpflegehelferin im Bethanienkrankenhaus in Frankfurt am Main  
1995-1998 MTLA am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen  
1998-2002 Während des Studiums Nacht- und Wochenenddienste am oben genannten Institut

**Derzeitige Tätigkeit:** Assistenzärztin der Inneren Medizin in der St.-Barbara-Klinik Hamm/Heessen

## Lebenslauf

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.