Aus dem Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung,
W.G. Kerckhoff-Institut, Abteilung für Experimentelle Kardiologie, Bad Nauheim
Betreuer: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wolfgang Schaper

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Anatomie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. vet. med. Dr. h.c. Rudolf Leiser

Die Rolle von endogenem FGF-1 bei akutem Herzinfarkt - eine Studie an FGF-1 transgenen Mäusen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Alexandra Bühler
Tierärztin aus Mannheim (Rhein-Neckar-Kreis)

Gießen 2002

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. vet. med. Dr. h.c. Bernd Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wolfgang Schaper

2. Berichterstatter: Prof. Dr. vet. med. Dr. h.c. Rudolf Leiser

Tag der mündlichen Prüfung: 27. August 2002

"Das Leben beginnt mit dem ersten Herzschlag und geht mit dem letzten zu Ende"

Aristoteles

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. EINLEITUNG und ZIELSETZUNG 1

II. LITERATURÜBERSICHT 5

1. Koronare Herzerkrankung 5

2. Ischämie 7

3. Tiermodell 8

4. Pathologie des Herzinfarktes 11

5. Ischämische Präkonditionierung 13

6. Wachstumsfaktoren 15

6.1. Fibroblasten Wachstumsfaktoren 16

6.1.1. Fibroblast Growth Factor 1 (FGF-1) 17

6.2. FGF-Rezeptoren und Signaltransduktionsweg 18

7. Gentherapie und genmanipulierte Mäuse 19

III. MATERIAL 21

1. Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel 21

2. FGF-1 transgenen Mäuse 21

3. Operationszubehör 22

4. Pharmaka 22

5. Histologie und Planimetrie 23

5.1. Antikörper 23

5.2. Geräte 23

5.3. Färbungen 23

5.4. Sonstiges 24

Seite

6. Hard- und Software 24

7. Western Blot Analyse 24

7.1 Antikörper 24

7.2 Geräte 25

7.3 Sonstiges 25

8. Allgemeine Puffer und Lösungen 25

9. Spezielle Puffer und Lösungen 26

IV. METHODEN 29

1. Transgenes Tiermodell 29

2. Kurzzeit-Ischämiemodell 30

2.1. Infarktinduzierung 31

2.2. Infarktgrößenbestimmung 34

2.3. Blutdruckmessungen 38

2.4. Signaltransduktionsweg 39

2.4.1. Immunologische Methoden (Western-Blot-Analyse) 39

2.4.2. Hemmung der MAPKinasen ERK-1/-2 durch UO126 42

3. Langzeit-Ischämiemodell 43

3.1. Infarktinduzierung 43

3.2. Hämodynamische Messungen 44

3.3. Histologie 45

3.3.1. Bestimmung der Morphologie 45

3.3.2. Bestimmung der Kapillardichte 47

3.3.3. Bestimmung der Apoptoserate 49

4. Statistische Analyse 50

Seite

V. ERGEBNISSE 51

1. Kurzzeitischämie 51

1.1. Infarktentwicklung 52

1.1.1. Beteiligung der MAPKinasen 54

1.1.2. Hemmung von P-ERK-1 und P-ERK-2 56

1.2. Blutdruck und Herzfrequenz 59

2. Langzeitischämie 61

2.1. Hämodynamik 61

2.2. Histologie 62

2.2.1. Infarktgrößen 62

2.2.2. Kapillarisierung 62

2.2.3. Gewebeumbau im intraventrikulären Septum 65

2.2.4. Apoptose 65

VI. DISKUSSION 67

1. Genlokalisationseffekt 67

2. Verzögerte Infarktentwicklung (Nekrose) aber gleicher Endeffekt 69

3. Diskussion der *in vivo* Propidium Färbung im Vergleich zur *ex vivo* Triphenyltetrazolium Chlorid-Färbung 70

4. Auswirkung einer kardialen FGF-1 Überexpression auf die Apoptose 71

5. Remodeling nach einwöchiger Infarktdauer 72

6. Hämodynamik 73

7. Elektrokardiogramm 74

8. Herzfunktionen nach einwöchigem Infarkt 76

9. Endogenes / Exogenes FGF-1 78

Seite

10. MAPKinasen / Signaltransduktionsweg 79

11. Zusammenfassung / Schlußfolgerung 81

12. Zukunftsaussichten 82

VII. ZUSAMMENFASSUNG 85

VIII. SUMMARY 89

IX. ABKÜRZUNGEN 93

X. ANHANG 95

1. Mäusemodell 95

1.1. Genetischer Hintergrund der Mäuselinien 95

1.2. Histologischer Phänotyp 98

XI. LITERATURVERZEICHNIS 101

XII. DANKSAGUNG 123

XIII. CURRICULUM VITAE 127

I. EINLEITUNG und ZIELSETZUNG

Der akute Herzinfarkt ist eine der häufigsten Todesursachen in West-Europa und den USA. Er ist definiert als eine schlagartig auftretende, länger andauernde Unterbrechung des koronären Blutflusses. Hierdurch kann das Herzgewebe nicht mehr in ausreichendem Maße versorgt werden und geht, abhängig von der Dauer des Gefäßverschlusses, zugrunde. Aufgrund der heute möglichen, frühen Behandlungsmöglichkeiten nach einem Myokardinfarkt, wie z.B. die Wiederherstellung des Blutflusses und der thrombolytischen Therapie, überleben immer mehr Menschen einen solchen Infarkt. Noch immer kann jedoch nur einem Teil der Betroffenen geholfen werden. Daher sind Ärzte und Wissenschaftler gleichermaßen auf der Suche nach neuen Therapieansätzen und nach Substanzen, die vor einem Zugrundegehen des Herzgewebes schützen und die Herzfunktionen wieder herstellen können.

Wachstumsfaktoren wie z.B. Fibroblast Growth Factor (FGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Insulin Growth Factor (IGF) haben sich in tierexperimentellen Versuchen als potentiell interessante Substanzen erwiesen. Sie wurden bereits mit vielversprechendem Erfolg in klinischen Studien bei Verschlüssen von Herz- und Beingefäßen eingesetzt. Hiermit wurde vor allem eine vermehrte Gefäßneubildung und verbesserte Herzfunktionen erreicht [1-5]. Einige dieser Wachstumsfaktoren haben aber auch einen direkten Einfluß auf das Überleben von Zellen bei einer Sauerstoffunterversorgung wie sie auch bei einem Gefäßverschluß vorkommt [6-8].

Eine sichere Aussage über den Nutzen dieser Therapieform kann jedoch noch nicht gemacht werden. Aufgrund der unterschiedlichen Auswahlkriterien bzgl. Patienten, verwendetem Wachstumsfaktor und dessen Applikation, sowie dem bewerteten Endziel, ist ein Vergleich der unterschiedlichen klinischen Versuchsreihen schwierig bis unmöglich. In der Literatur wurden außerdem auch Doppelblindstudien beschrieben, die kein vermehrtes Gefäßwachstum nachweisen konnten [9].

Auch Versuchsreihen in unserem Hause mit verschiedenen Wachstumsfaktoren (FGF, VEGF, etc.) haben gute Erfolge bzgl. Gefäßneubildung und verzögerter Infarktentwicklung bei Schweinen, Kaninchen und Mäusen gezeigt [10]. Einer dieser Faktoren, der Fibroblast Growth Factor-1 (FGF-1), scheint uns aufgrund der bisher erzielten Resultate ein guter Kandidat für eine Anwendung am Menschen zu sein [11,12].

In der Literatur ist bereits beschrieben, daß in Tierversuchen die Anwendung von FGF-1 je nach Versuchsaufbau entweder in einer verzögerten Infarktentwicklung und/oder in einer vermehrten Gefäßdichte sowie einer verbesserten Herzfunktion nach einem Infarkt resultiert [10,13-15]. Bisher war jedoch noch nicht geklärt, ob der herzschützende, also kardioprotektive Effekt, auf die Tatsache zurückzuführen ist, daß durch FGF-1 vermehrt Gefäßwachstum auftritt, oder, was unsere Hypothese war, durch andere, nicht gefäßbezogene, trophische Faktoren. Desweiteren ist in der Literatur bereits beschrieben worden, daß Unterschiede in der Wirkungsweise von exogenem und endogenem FGF-1 bestehen. Während exogenes FGF-1 vermehrt das Gefäßwachstum anregt, liegen deutliche Indizien dafür vor, daß endogenes FGF-1 Zellen vor dem Zugrundegehen schützen, bzw. ihren Tod verzögern kann [16].

In tierexperimentellen und klinischen Studien wurden bisher Wachstumsfaktoren mit zeitlich begrenzter Wirkungsdauer eingesetzt. Der Grund hierfür ist, daß entweder das Protein selbst, nackte DNS oder die virale Transfektion z.B. mit Adenoviren benutzt wurde. Auch die Applikation erfolgte sehr unterschiedlich. Teilweise wurden die Faktoren, bzw. der Virus, direkt ins Herzgewebe injiziert, über einen Katheter in die Gefäßwand eingebracht oder über ein implantiertes Schwämmchen kontinuierlich an das umliegende Gewebe abgegeben. Ein Nachteil all dieser Techniken ist, daß hierfür meist eine Thorakotomie notwendig ist und die Wachstumsfaktoren - abhängig von der Art und Weise der Applikation - nur wenige Tage bis Wochen ihre Wirkung entfalten können [9]. Mit diesen Untersuchungen war es also nicht, oder nur sehr begrenzt, möglich, die für den Aufbau eines funktionierenden Ersatzgefäßbettes notwendige längerfristige Anwesenheit des Wachstumsfaktors zu ermöglichen. Auch kann die zugrundeliegende Wirkungsweise in diesen Modellen nur beschränkt untersucht werden. Da jedoch bereits die kurzfristige Therapie erste Erfolge bezüglich verbesserter Herzfunktionen zeigen konnte, ist man nun auf der Suche nach anderen Techniken, die auch eine längerfristige Expression des Wachstumsfaktors ermöglichen.

Seit einigen Jahren besteht die Möglichkeit, das Genom von Tieren zu verändern. Derartige Tiermodelle ermöglichen es, sowohl die Entstehung und Entwicklung genetisch bedingter Erkrankungen zu untersuchen, als auch neuartige Therapieansätze für verschiedenste Erkrankungen zu erproben. Die Verwendung eines kliniknahen Tiermodells ist eine der Grundvoraussetzungen für die erfolgreiche Entwicklung von geeigneten Medikamenten für den Menschen, die entweder eine Herzinfarkterkrankung verhindern, vermindern oder heilen können, oder zumindest in der Lage sind, die Lebensqualität nach einer Erkrankung zu verbessern.

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, die Möglichkeiten von Wachstumsfaktoren, insbesondere von FGF-1, in Bezug auf ihr therapeutisches Potential aufzuzeigen. Desweiteren sollte die Frage geklärt werden, ob der vaskulogene oder der trophische Effekt für die Kardioprotektion verantwortlich sein würde. Hierfür haben wir Mäuse generiert, die das humane FGF-1 spezifisch im Herzen überexpremieren. Hierdurch besitzen diese Tiere permanent eine erhöhte Konzentration von FGF-1 im Herzen. Ziel der Untersuchungen war es, den Effekt einer Überexpression von FGF-1 im Mäuseherz festzustellen und zu charakterisieren. Es ging primär um die Frage, ob eine permanente Überexpression von FGF-1 im Herzen Auswirkungen auf den Phänotyp dieser Mäuse haben würde. Zu erwarten war außerdem, daß in einem solchen Tiermodell die Folgen einer durch akuten Verschluß eines Herzgefäßes induzierten Ischämie weniger starke Auswirkungen auf das Zugrundegehen von Herzgewebe haben würde. Die Ursache hierfür sollte außerdem erforscht werden. Weiterhin wurde eine positive Wirkung von FGF-1 bei länger andauerndem akuten Verschluß desselben Gefäßes durch vermehrte Angiogenese und infolgedessen verbesserte Herzfunktionen erwartet.

Wie bereits besprochen, haben Wachstumsfaktoren u.a. einen Einfluß auf die Gefäßanatomie bezüglich Differenzierung und/oder Wachstum des arteriellen Gefäßsystems. Wie würde dieses bei Mäusen aussehen, die einen kardialen Überschuß an FGF-1 aufweisen? Gäbe es mehr Gefäße im Herzen? Falls ja, waren dies dann Kapillaren, Arteriolen oder Arterien? Würden vielleicht sogar mehr Kollateralen entwickelt werden? Dann müßte auch die Infarktentwicklung beeinflußt werden.

Vor Durchführung der Versuche war nicht absehbar gewesen, ob eine permanente herzspezifische Überexpression überhaupt noch kardioprotektiv sein würde oder nicht. Vielleicht würde zum Ausgleich dieses Überschusses eine Abregulation der Rezeptoren erfolgen und damit eine transgene Überexpression keinen Effekt haben. Im Falle einer noch vorhandenen, bzw. verstärkten Kardioprotektion galt es zu klären, ob hierfür angiogene, arteriogene oder - wie wir vermuteten - nicht-vaskuläre, trophische Faktoren zuständig waren. Hierbei galt es natürlich auch das Ausmaß einer eventuellen Protektion zu ermitteln.

In früheren Versuchen an Schweinen konnten wir bereits zeigen, daß eine intramyokardiale Infusion von FGF-1 und/oder FGF-2 in der Lage war, den kardioprotektiven Effekt von ischämischer Präkonditionierung nachzuahmen [10]. Mit dem transgenen Mäusemodell ist es nun möglich, den hierfür verantwortlichen Signaltransduktionsweg von FGF-1 genauer zu studieren .

Bisherige Untersuchungen haben jedoch nicht nur einen positiven Effekt von Wachstumsfaktoren gezeigt (Kollateralwachstum, Protektion verschiedenster Art, beschleunigte Wundheilung, etc.), sondern auch die Befürchtung geäußert, daß es bei einer Behandlung mit Wachstumsfaktoren unter Umständen auch zu einem nicht zu unterschätzenden negativen Effekt - dem erneuten Verschluß von Gefäßen durch überschießende Proliferation, dem vermehrten Auftreten von Tumoren und zur Ruptur von ehemals stabilen Plaques kommen kann [9,17]. Diese Fragestellung ist natürlich auch in Hinsicht auf Möglichkeiten zur Gentherapie interessant. Schließlich gilt es mögliche Nebenwirkungen, wie z.B. vermehrtes Tumorwachstum zu überprüfen und nach Möglichkeit auszuschließen.

Da die Maus das ideale Medium für genetische Veränderungen ist, auch in Hinblick auf eine relativ günstige und einfache Haltung und die kurzen Reproduktionszeiten, wurde mit dem murinen Modell der Infarktinduzierung gearbeitet. Das Genom der Maus ist gut bekannt und leicht manipulierbar. Bereits 1995 haben Michael und Mitarbeiter das Mäusemodell der kardialen Ischämie und Reperfusion ausführlich beschrieben [18].

Das Mäusemodell der herzspezifischen Überexpression von FGF-1 wurde speziell hierfür unter Federführung des Max Planck Institutes für physiologische und klinische Forschung, Abteilung für Experimentelle Kardiologie, generiert. Zur Interpretation der gewonnenen Daten ist eine genaue Kenntnis der Entstehung des Konstrukts und der Herstellung der transgenen Mäuse notwendig. Da dies jedoch nicht Bestandteil meiner Doktorarbeit ist, werde ich hierauf erst im Anhang näher eingehen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Koronare Herzerkrankung

Die koronare Herzerkrankung ist in den westlichen Industrieländern die häufigste Todesursache beim Menschen. Sie manifestiert sich in einer Ischämie des Herzmuskels mit den Krankheitsbildern einer Angina pectoris, eines Myokardinfarktes oder einer Linksherzinsuffizienz.

Im Roche Lexikon Medizin [19] wird der Myokardinfarkt folgendermaßen beschrieben:

"Der Myokardinfarkt oder auch Herz(muskel)infarkt ist ein durch Koronarinsuffizienz, das heißt durch rasche, kritische Ausmaße erreichende Einengung eines Koronararterienastes bedingtes “territoriales Mangel-Versorgungsgebiet des Myokards” mit mehr oder weniger ausgedehntem Gewebsuntergang (Myokardnekrose) eines ganzen Wandabschnittes (=transmuraler Myokardinfarkt wenn mehr als die halbe Wanddicke betroffen ist) oder nur begrenzter Wandbereiche (subendokardialer, rudimentärer oder Teilschichtinfarkt). Die Infarkte werden nach ihrer Lokalisation benannt. … Die Sterblichkeit beträgt 20-40%; trotz Frührehabilitation besteht eine starke Rezidivneigung."

Beim Mensch liegt dem Herzinfarkt in der Regel eine atherosklerotische Erkrankung der Herzkranzgefäße zugrunde. Das klinische Bild des Myokardinfarktes ist durch unterschiedliche, zum Teil stark wechselnde Symptome charakterisiert. In der Mehrzahl der Fälle läßt sich eine sogenannte Myokardinfarkt-Trias nachweisen: Herzschmerz, Blutdruckabfall und Tachykardie. Für die Diagnose eines frischen Infarktes sind neben typischen Elektrokardiogramm - Veränderungen die Konzentrationsänderungen bestimmter Enzyme im Blutplasma von Bedeutung (Creatin-Phosphokinase, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und Lactat-Dehydrogenase) [20].

In den letzten fünf Jahrzehnten, sind bedeutende Fortschritte in der Behandlung von akuten Herzinfarkten und der Prophylaxe eines solchen erreicht worden. Insbesondere die Behandlung von möglicherweise fatalen Arrhythmien in “Coronary Care Units” [21] und Strategien zur Verminderung von Infarktgrößen durch die Einführung der Gabe von Nitraten [22] und ß-Blockern [23] haben große Fortschritte gebracht. Auch die Möglichkeit einer Katheterisierung [24], einer Bypass-Operation [25] oder Herztransplantation verringert die Todesrate und erhöht die Lebensqualität der Betroffenen. Jedoch tritt hierbei häufig das Problem der Reokklusion auf [26,27]. Mit den größten Anteil an einer verminderten Todesrate nach

einem akuten Herzinfarkt haben die Einführung von thrombolytischen Wirkstoffen (Aspirin, Heparin, etc.) [28] und die direkte percutane transluminale Koronare Angioplastie [29]. Dennoch bleibt Herzversagen die führende Ursache für Einlieferungen in die Klinik und die hohe Sterberate bei Patienten mit akutem Herzinfarkt [30].

Daher wird kontinuierlich nach neuen Möglichkeiten gesucht, um sowohl verstärkt prophylaktisch als auch therapeutisch eingreifen zu können. Eine gänzliche Vermeidung eines Infarktes wird innerhalb der nächsten Jahre vermutlich noch nicht möglich sein, aber bereits eine Verkleinerung des infarzierten Gebietes oder eine zeitliche Verzögerung der Infarktentwicklung und somit mehr Zeit zum Intervenieren würde bereits erheblich die Überlebenschancen und die Rekonvaleszenzmöglichkeiten der Betroffenen erhöhen. Es gilt also nicht nur die Patienten am Leben zu erhalten, sondern ihre Lebensqualität nach einem Infarkt im Vergleich zu bisher zu erhöhen oder - noch besser - völlig wieder herzustellen. Schließlich sind viele Patienten, die den akuten Herzinfarkt überleben, in starkem Maße behindert und somit ist diese Erkrankung auch aus finanzieller Sicht und als soziale Belastung bedeutend [31].

Ein Ansatzpunkt für neue Therapiemöglichkeiten ist, daß die Entwicklung von neuen Gefäßen (Angiogenese; Abb. 1) oder, daß der Umbau von bereits bestehenden Kollateralen (Arteriogenese; Abb. 1) natürliche Bypässe formen könnte, die die Auswirkungen einer Okklusion von epikardialen Koronararterien kompensieren könnten und folglich auch die Überlebenschancen nach einem akuten Herzinfarkt erhöhen. Diese Möglichkeit wird bisher in klinischen Trials mit Hilfe von verschiedenen Wachstumsfaktoren untersucht [9,32]. Dies geschieht an Patienten, bei denen keine bisher gebräuchliche Therapie anschlägt. Es handelt sich hierbei nicht nur um Therapien bei Herzischämie, sondern auch bei peripherer Ischämie [4,32]. Diese Behandlung hat bisher sehr gute Erfolge gezeigt. Die Patienten zeigten nach der Therapie in dem betroffenen ischämischen oder hypoxischen Gewebe eine Gefäßneubildung, bzw. einen Gefäßumbau (Oberschenkel: Arteriogenese; Unterschenkel (Ischämie): Angiogenese) mit verbesserter Durchblutung und im Bezug auf das Herz zusätzlich verbesserte Herzfunktionen [33]. Es darf allerdings auch nicht verschwiegen werden, daß auch diese Therapien unter Umständen nicht ohne Nebenwirkungen sind. Aufgrund der biologischen Aktivität von Wachstumsfaktoren können diese z.B. eine Gefäßneubildung in einem anderen als dem Zielgewebe, eine vermehrte Instabilität von atherogenen Plaques oder ein vermehrtes Tumorwachstum sein. Dieses hat sich in den bisherigen klinischen Studien jedoch nicht bestätigt [9,32].

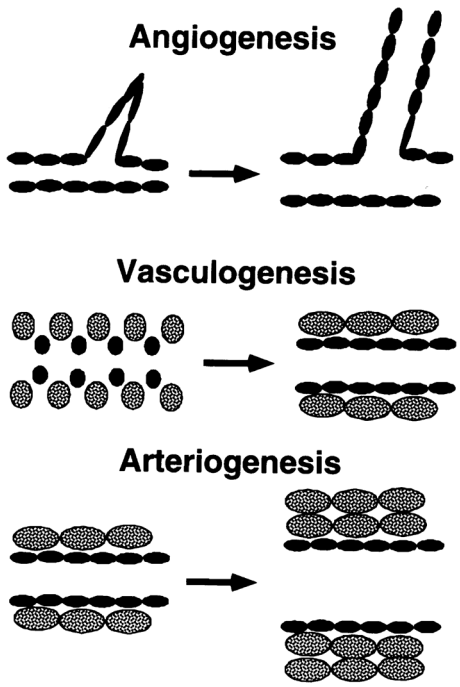

Abb. 1: Darstellung der verschiedenen Möglichkeiten der Gefäßbildung
*Unter **„Angiogenese“** versteht man die "De novo- Formation" neuer Gefäße in einem adulten Organismus (Kapillarwachstum). **„Vaskulogenese“** wird die Entwicklung großer Gefäße im Embryo aus Hämangioblasten (Vorläuferzellen, die Blut- und Gefäßzellen bilden) genannt. Dies entspricht der Formation eines primitiven Gefäßnetzwerkes. Der Begriff **„Arteriogenese“** bezeichnet die Entwicklung bereits vorhandener Arteriolen-Anastomosen zu großen Kollateralgefäßen.*
Quelle: W. Schaper et al. [34]

2. Ischämie

Ein Gefäßverschluß führt zu einer Reihe von Veränderungen im Gefäß selbst, im umliegenden Gewebe und - je nach Ausmaß des Schadens - auch im ganzen Organismus. In den häufigsten Fällen sind mehrere Gefäße betroffen. Außerdem gibt es meist nicht genügend Kollateralen, die die Versorgung des betroffenen Gebietes aufrecht erhalten können. Daher ist durch einen Verschluß sowohl die Anals auch die Abfuhr verschiedener Stoffe nicht mehr möglich. Hierdurch kommt es unter anderem zu einer Sauerstoffunterversorgung und einer Anhäufung von Stoffwechselabbauprodukten, die ihrerseits weitere Schäden im Gewebe verursachen.

Alle Abläufe nach Verschluß eines Gefäßes, die Sauerstoffmangel, Abblassung, Abkühlung, Volumenabnahme der betroffenen Gewebe und eventuell Nekrotisierung einschließen, führen zur Ischämie. Unter Ischämie versteht man die Blutleere oder die Minderdurchblutung eines Gewebes infolge unzureichender (relative Ischämie) oder fehlender (absolute Ischämie) arterieller Blutzufuhr [19]. Eine Ischämie kann abhängig von ihrer Dauer reversibel oder irreversibel sein [35].

Eine Sauerstoffunterversorgung zu Beginn der Ischämie bedingt schnelle Veränderungen in dem myokardialen Metabolismus und der Herzfunktion. Innerhalb von 10-15 Sekunden nach Okklusion kommt es zu einer Absenkung des partialen Sauerstoffdruckes im Gewebe, die Atmung der Mitochondrien wird behindert und die Myozyten beginnen die anaerobe Glycolyse als Hauptlieferant für neue, hoch-energetische Phosphate zu nutzen. Als Konsequenz hiervon sinkt der zelluläre Glykogenspiegel und die daraus entstehende Milchsäure beginnt sich im ischämischen Gebiet anzusammeln. Auch die Kontraktilität stoppt bei schwerer Ischämie innerhalb von 10-15 Sekunden. Trotz dieser schwerwiegenden und innerhalb von wenigen Sekunden einsetzenden Veränderungen, sind die Herzmuskelzellen noch immer lebensfähig. Sie befinden sich zu diesem Zeitpunkt in einer sogenannten „Toleranzphase“. Wird innerhalb dieser Phase das Gewebe reperfundiert, ist normalerweise kein bleibender Schaden vorhanden [35,36].

Als Toleranzphase verlängernde Substanzen sind unter anderem Wachstumsfaktoren, wie Fibroblast Growth Factors (FGFs) und Insulin Growth Factors (IGFs) identifiziert worden [10,37].

Wenn eine reversible Ischämie nicht rechtzeitig reperfundiert wird, folgen Schäden an den Herzmuskelzellen, die im Verlauf der weiteren Ischämie zunehmen und zum Zelltod führen. Der “point-of-no-return” beschreibt den Punkt, an dem eine Regeneration der Zellen unmöglich wird. Dies bedeutet, daß eine irreversible Schädigung eintritt, die auch nicht durch Aufhebung der Ischämie (“Reperfusion”) zu beheben ist [38]. Wenn der “point-of-no-return” einmal erreicht ist, schreitet die Zerstörung des Gewebes unaufhörlich voran und aktiviert zusätzlich verschiedene, vielschichtige Abläufe von Entzündungsreaktionen [39,40].

3. Tiermodell

Die koronare Herzerkrankung hat bei den Versuchstieren kaum Bedeutung. Sie kann jedoch durch gezielte Experimente am Tier ausgelöst und in ihren Auswirkungen nachgeahmt werden [18,41]. Der Wahl des geeigneten Versuchstiers kommt entscheidende Bedeutung zu. Unterschiede sowohl zwischen Mensch und Tier, aber auch zwischen den einzelnen Tierspezies bzgl. Anatomie, Physiologie und Pathologie sind zu beachten, da nicht jedes Tier zum Simulieren einer bestimmten Erkrankung gleich gut geeignet ist. Ein limitierender Faktor ist z.B. die Größe des zu untersuchenden Organs.

Das Zielorgan der vorliegenden Arbeit ist das Herz der Maus. In vergleichbaren Versuchen wurden bisher das Schwein oder der Hund verwendet. Die Gründe,

warum wir uns dennoch für die Maus entschieden haben sind vielschichtig. Vorteilhaft an der Maus sind die einfache und kostengünstige Haltung - auch in größeren Anzahlen - die schnelle Reproduktion der Tiere und auch die relativ einfache Manipulationsmöglichkeit des Mäusegenoms. Bereits 1981 wurde die erste transgene Maus in der Literatur beschrieben [42,43] und wenige Jahre später, 1996, war der genetische Plan der Maus komplett identifiziert worden [44]. Das menschliche und das murine Genom sind zu ca. 85% identisch [44].

Obwohl das Herz der Maus natürlich viel kleiner ist, ist aufgrund der heutigen mikrochirurgischen Techniken eine operative Auslösung eines Myokardinfarktes an der Maus möglich. Außerdem erlauben die heutzutage stets besser und genauer werdenden molekularbiologischen Techniken die Aufarbeitung sehr kleiner Gewebestücke. Die Proben des infarzierten Herzgewebes haben bei den *in vivo* Versuchen an Mäusen ein Gewicht von nur 2 mg. Dies stellt jedoch kein Problem dar. Eine Technik, die bisher noch nicht an die Kleinheit des Mäuseherzens (ca. 100mg) angepaßt werden konnte, ist die Bestimmung des Kollateralflusses. Hierfür ist Gewebe von mindestens 1 g nötig. Dies entspricht der Größe eines Rattenherzens.

Zum Identifizieren des infarzierten Gewebes wurde bisher meistens die sogenannte Triphenyltetrazolium Chlorid-Färbung verwendet. Hierbei ist jedoch zu beachten, daß die Reperfusionsphase, die benötigt wird, um diese Färbung zum Identifizieren des infarzierten Gewebes verwenden zu können, tierartlich sehr unterschiedlich ist. Bei der Maus beträgt diese mindestens 3 Stunden [45]; beim Schwein oder beim Hund jedoch nicht länger als 60 Minuten. In unserem Mäusemodell haben wir durch die *in vivo* Anwendung der noch relativ neuen, aber gut charakterisierten Methode der Propidium Iodid-Anfärbung von toten Zellen im lebenden Tier die Reperfusionsdauer auf 20 Minuten verkürzen können [46,47].

Anatomische Unterschiede zwischen Mäuse- und Menschenherz finden sich vorallem im Hinblick auf die Blutgefäßversorgung des Herzens. Beim Menschen ist die Arteria coronaria sinistra mit ihrem Ramus interventricularis anterior der im interventrikulären Septum liegt, das für die kardiale Durchblutung bedeutendste Gefäß. Hier hingegen sind beim Mäuseherzen im Allgemeinen eine linke und eine rechte Koronararterie ausgebildet. Das Septum wird in den meisten Fällen von einer Septalarterie versorgt, die ihren Ursprung in der rechten Koronararterie hat [18,48]. Daher ist bei den induzierten Myokardinfarkten das Septum meistens nicht infarziert. In Abbildung 2 ist die Anatomie anhand eines Herzgefäßausgusses dargestellt.

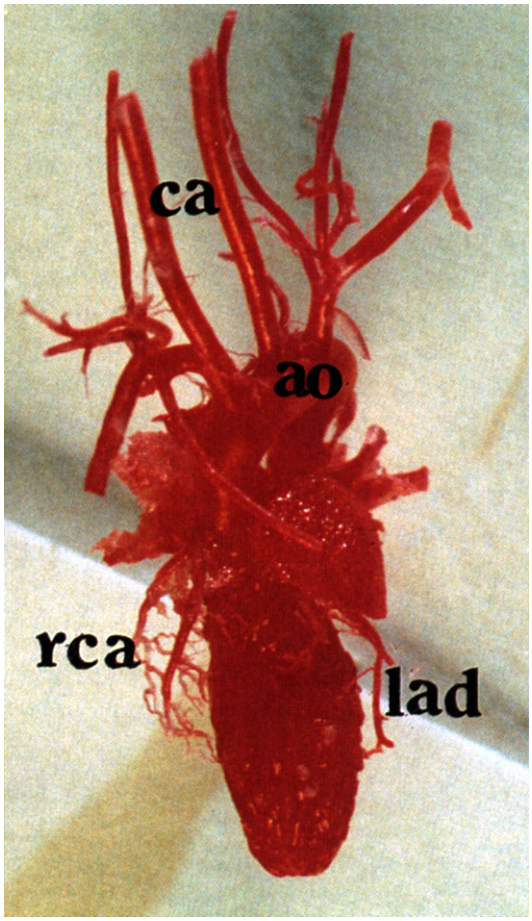

Abb. 2: Herzausguß des arteriellen Systems und der Koronararterien eines Mäuseherzens. ***rca****: rechte Koronararterie, die sich in zwei Gefäße aufteilt nach dem Verlassen der Aortawurzel;* ***lad****: linke Koronararterie;* ***ao****: Aortabogen;* ***ca****: Aa. Coronariae. Quelle: L.H. Michael et al.* [18]

Bei der Maus wird die linke Koronararterie ca. 2-3 mm apikal vom linken Herzohr okkludiert. Somit wird die linke Koronararterie oberhalb der Abzweigung des "obtuse marginal branch" okkludiert [18]. Auf diese Weise werden bei der Maus Infarkte in solchen Gebieten induziert, wie sie auch beim Menschen häufig gefunden werden [18]. Ein weiterer, für die Interpretation der Resultate unserer Experimente jedoch unbedeutender Unterschied, ist der intramyokardiale Verlauf der Herzgefäße bei der Maus [18,48]. Beim Mensch verlaufen diese subepikardial. Aufgrund der intramyokardialen Lage der Arterien und der geringen Größe des Mäuseherzens, wird die Operation an der Maus mit Hilfe eines Operationsmikroskopes durchgeführt.

Die zeitlichen Abläufe sind bei der Maus naturgemäß schneller als beim Menschen, laufen aber in vergleichbarer Art und Weise ab [18]. Hierdurch sind die Auswirkungen der Okklusion und der nachfolgenden Ischämie zwischen Mensch und Maus vergleichbar. Das Mausinfarktmodell ist gut untersucht und allgemein anerkannt [18].

4. Pathologie des Herzinfarktes

In den meisten Fällen handelt es sich bei einem Herzinfarkt um eine sich langsam entwickelnde Erkrankung. Häufig gehen atherosklerotische Erkrankungen der Herzkranzgefäße einem Infarkt voraus. Daher betrifft der Gefäßverschluß nicht nur einzelne, sondern meistens mehrere Gefäße, deren Verengung langsam fortschreitet. Im späteren Stadium kommt eine Okklusion entweder durch vermehrte Plaquebildung (chronischer, langsam fortschreitende Prozess) oder durch thrombotischen Verschluß stromaufwärts liegender kleinerer Gefäßen nach Ablösung eines Plaques (akuter Prozess) zustande [49].

Meist tritt ein Herzinfarkt für den Betroffenen selbst überraschend und unerwartet auf. Hierfür gibt es zwei Hauptgründe: In vielen Fällen konnten vor dem Infarkt keine Anzeichen eines bevorstehenden Infarkt festgestellt werden; häufig sind jedoch auch Vorzeichen vorhanden, die von dem Betroffenen nicht ernstgenommen oder falsch gedeutet werden. Dies verdeutlicht, warum Patienten erst nach einem Herzinfarkt in eine Klinik kommen und erst dann - mit Minuten bis Tagen Verzögerung - behandelt werden können. Akute Maßnahmen, wie z.B. thrombolytische und gerinnungshemmende Mittel (z.B. Heparin, Aspirin), haben dann natürlich nur noch eine begrenzte Wirkungsmöglichkeit. Operationen sind oft aufgrund eines schlechten Allgemeinbefindens und der sehr hohen Wahrscheinlichkeit einer Rezidivbildung risikoreich (30% nach 1 Jahr) und nicht von bleibendem Erfolg (durchschnittlich 8 Jahre bei einer Bypass-Operation) [50-53].

Dies bedeutet, daß Möglichkeiten gefunden werden müssen, die betroffenen Gebiete wieder, bzw. besser, mit Blutfluß zu versorgen. Abhängig von der Verschluß-Ursache, akut oder chronisch, sollte ein prophylaktischer, bzw. therapeutischer Ansatz erfolgen. Dies wäre bei einem langsam fortschreitenden Gefäßverschluß über eine Erhöhung der Gefäßdichte (Angiogenese) oder einer vermehrten Kollateralbildung (Arteriogenese) im hypoxischen Gebiet möglich, da so der Verschluß einzelner Gefäße kompensiert wird und im Idealfall eine Ischämie vermieden werden kann [54].

Bei akuten Gefäßverschlüssen ist die Förderung der Entwicklung von neuen Gefäßen in dem Randgebiet zwischen Risiko- und Nicht-Risikogebiet (Angiogenese) denkbar. Diese führen dann zu einer verbesserten lokalen Perfusion und infolgedessen zu verbesserten Funktionen im ischämischen, aber nicht nekrotischen Gebiet. Dies wiederum bewirkt eine Verbesserung der linksventrikulären Funktionen und des Gewebeumbaus. Beide Determinanten sind von großem Interesse für die spätere Prognose. Selbst bei einem schon bestehenden Gewebsuntergang konnte eine positive Beeinflussung des Krankheitsverlaufs

nachgewiesen werden [31]. Dies wurde nicht nur durch Tierversuche, sondern auch durch Untersuchungen an Patienten mit akuten myokardialen Infarkten bestätigt [55-64].

Da die neuen Gefäße einige Tage brauchen um sich voll zu entwickeln, ist der Prozess der Gefäßentwicklung sehr zeitintensiv. Tierexperimentelle Untersuchungen lassen darauf schließen, daß sowohl die Vergrößerung bereits existierender Gefäße, als auch die Gefäßneubildung ca. 24 Stunden für die erste zelluläre Mitose benötigen [65]. Eine funktionell effektive Kollateralzirkulation wird erst nach etwa 3 Tagen beobachtet [66]. Im Modell des akuten, länger andauernden Herzinfarktes bei der Maus ist die Angiogenese ca. 14 Tage nach Infarktinduktion maximal (Beobachtungen von Prof. M. Daemen und Prof. P. Carmeliet, noch nicht publiziert). Beim Menschen sind die ersten neuen Gefäßabzweigungen (Sprouts) drei Tage nach einem akuten Myokardinfarkt nachzuweisen [67]. Bisher ist jedoch nicht viel bekannt über den genauen zeitlichen Verlauf nach einem Infarkt und ab welchem Zeitpunkt funktionelle Gefäße vorhanden sind. Auch spielen beim Menschen viele verschiedene Komponenten eine nicht zu unterschätzende Rolle. Es wird diskutiert, daß bei älteren Menschen Angiogenese nicht mehr in solchem Maße auftritt wie bei jungen Menschen [68]. Auch haben Herzinfarkt-Patienten oft noch andere Erkrankungen, die Einfluß haben können auf die Angiogenese. Es kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, daß Medikamente wie z.B. Captopril und Furosemide, aber auch das allgegenwärtige Aspirin, Angiogenese hemmen [9]. Weiterhin ist auch nicht auszuschließen, daß dem zu behandelnden Herzinfarkt bereits Verschlüsse kleinerer Gefäße oder kurzzeitige Verschlüsse oder Einengungen anderer Gefäße vorausgegangen sind [9].

Nach einem akuten Gefäßverschluß ist der Verlauf für das Herzgewebe und somit für den Patienten drastischer als bei einem langsam fortschreitenden Gefäßverschluß. Aufgrund des schnellen Verschlusses und der damit verbundenen akuten Unterversorgung der Herzmuskulatur, hat das Herzgewebe keine Möglichkeit, sich auf die veränderte Situation einzustellen und die Gefäßversorgung anzupassen. Im Gegensatz zu einem langsamen Verschluß ist beim akuten Verschluß keine Möglichkeit zur Kollateralentwicklung gegeben. Dauerhaft muß dementsprechend bei einem akuten Infarkt das Gefäßwachstum gefördert werden, aber gleichzeitig müssen die Auswirkungen des akuten Verschlusses gemildert werden.

5. Ischämische Präkonditionierung

Sowohl die lokale intramyokardiale Applikation, als auch die systemische Infusion von Wachstumsfaktoren, kam in verschiedenen Tiermodellen mit Erfolg zum Einsatz. Der so erzielte anti-ischämische Schutz ist mit dem der Ischämischen Präkonditionierung vergleichbar. Dieser ist bei allen bisher studierten Tieren und dem Menschen nachweisbar [10,14,37].

Die Ischämische Präkonditionierung ist definiert als eine kurze reversible ischämische Periode (regional oder global), die vor einer längeren ischämischen Periode stattfindet. Hierdurch wird die Toleranz des Myokards gegenüber Ischämie erhöht. Dies geschieht durch endogene adaptive Mechanismen [69-71]. Durch Ischämische Präkonditionierung wird das Zugrundegehen der Zellen entweder limitiert oder zeitlich verzögert. Eine der ersten, die dieses Phänomen beschrieben haben, waren 1986 Murry, CE et al. [72] und die Gruppe um Professor W. Schaper [73].

Bisher sind zwei verschiedene Formen der Ischämischen Präkonditionierung bekannt. Erstere tritt innerhalb von wenigen Minuten auf und beschreibt einen zeitlichen Rahmen von 2-3 Stunden. Sie wird entweder als "frühe Präkonditionierung" oder als "klassische Präkonditionierung" bezeichnet [72]. Die zweite Form tritt erst nach 12-24 Stunden auf und hält 3-4 Tage an. Sie wird unter den Bezeichnungen "späte Präkonditionierung" oder "verzögerte Präkonditionierung" in der Literatur beschrieben [74-77].

In Abbildung 3 ist die Ischämische Präkonditionierung dargestellt. Nach einem kurzen ischämischen Insult kommt es - ausgelöst durch Adenosin, Bradykinin, Opioiden, Angiotensin II, Endothelin und Noradrenalin - zu einer Aktivierung von verschiedenen Membranrezeptoren. Via Phospholipase D (PLD) wird hiernach die Protein Kinase C (PKC) aktiviert. Auch die Tyrosin Kinase (TK) und die mitogen aktivierte Protein Kinasen (MAPKinasen) spielen eine wichtige Rolle im Signaltransduktionsweg. Dies gilt als der Auslöser der klassischen Präkonditionierung.

Parallel hierzu kommt es über eine Aktivierung verschiedener streß-relatierter Gene zu der Synthese verschiedener Proteine (z.B. Heat shock Proteine (HSPs) und der mitochondralen Isoform der antioxidativen Superoxid Dismutase (MnSOD)). Dies führt zu einer Aktivierung der späten Ischämischen Präkonditionierung [74,75]. Welche dieser Formen jedoch die klinisch relevantere ist, ist noch nicht eindeutig geklärt.

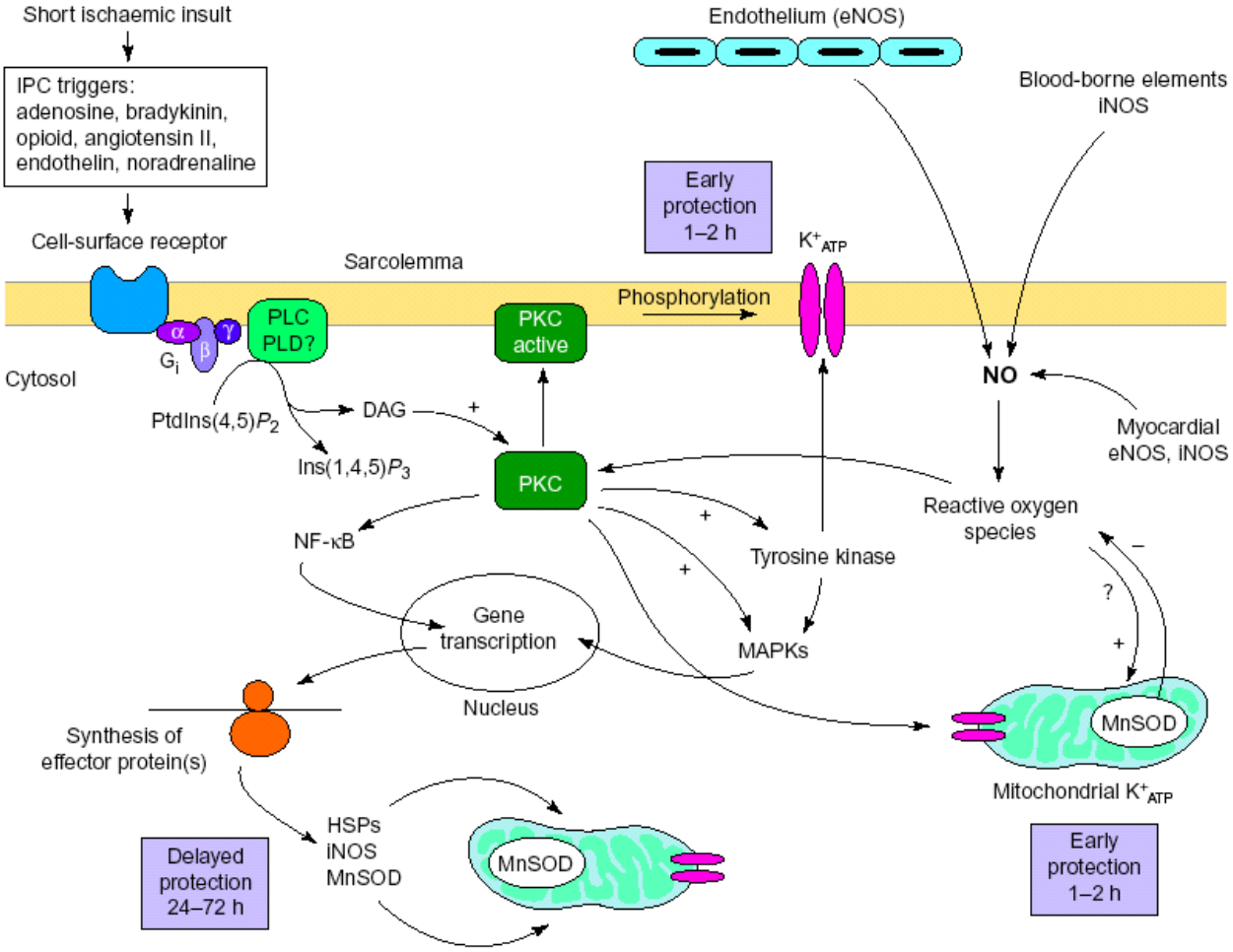

Abb. 3: Darstellung der Ischämische Präkonditionierung
Quelle: Rubino and Yellon [75]

Die Rolle der MAPKinasen während der ischämischen Präkonditionierung ist eines der Hauptinteressen in unserem Hause. Mit Hilfe von spezifischen Inhibitoren ist es möglich, die Signalkaskade an unterschiedlichen Punkten zu stoppen. Im Falle der MAPKinasen wird hierfür häufig UO126 benutzt. Dies ist ein spezifischer MEK 1/2 und ERK-1/-2 Inhibitor (Abb. 4). Er macht die Phosphorylierung und somit die Aktivierung von ERK-1 und ERK-2, zweier MAPKinasen, unmöglich [78,79]. Diese Substanz haben wir für die hier vorliegende Signaltransduktionsstudie benutzt.

Die frühe Präkonditionierung kann durch Infusion von verschiedensten Pharmaka die Nekroseentwicklung verzögern [10,37]. Allerdings kann selbst eine kontinuierliche Infusion dieser Substanzen nicht dauerhaft vor einem Gewebeuntergang schützen. Dies liegt vor allem in einer Desensibilisierung von Adenosin Rezeptoren. Man kann davon ausgehen, daß dieses Problem bei der therapeutischen Nutzung der späten Präkonditionierung nicht auftritt. Hierbei ist eine pharmakologische Behandlung alle 48-72 Stunden ausreichend, um noch kardioprotektiv wirksam zu sein [74]. Aufgrund der verzögerten und längeren Dauer ist sie daher besser therapeutisch nutzbar. Roberto Bolli beschrieb in seinem Review "The late phase of

preconditioning" [74], daß gerade die späte, verzögerte Phase der Präkonditionierung größere klinische Bedeutung hat. Untersuchungen haben nämlich gezeigt, daß die späte Präkonditionierung eine universale Antwort des Herzens auf Stress darstellt. Hierfür ist die gleichzeitige Aktivierung verschiedener stress-relatierter Gene verantwortlich. Die späte Phase kann, genau wie die frühe Phase, pharmakologisch mit klinisch relevanten Substanzen reproduziert werden [74].

Im Gegensatz zu anderen Studien, konnte in unserem Hause bei Schweinen jedoch keine späte Phase beobachtet werden [80].

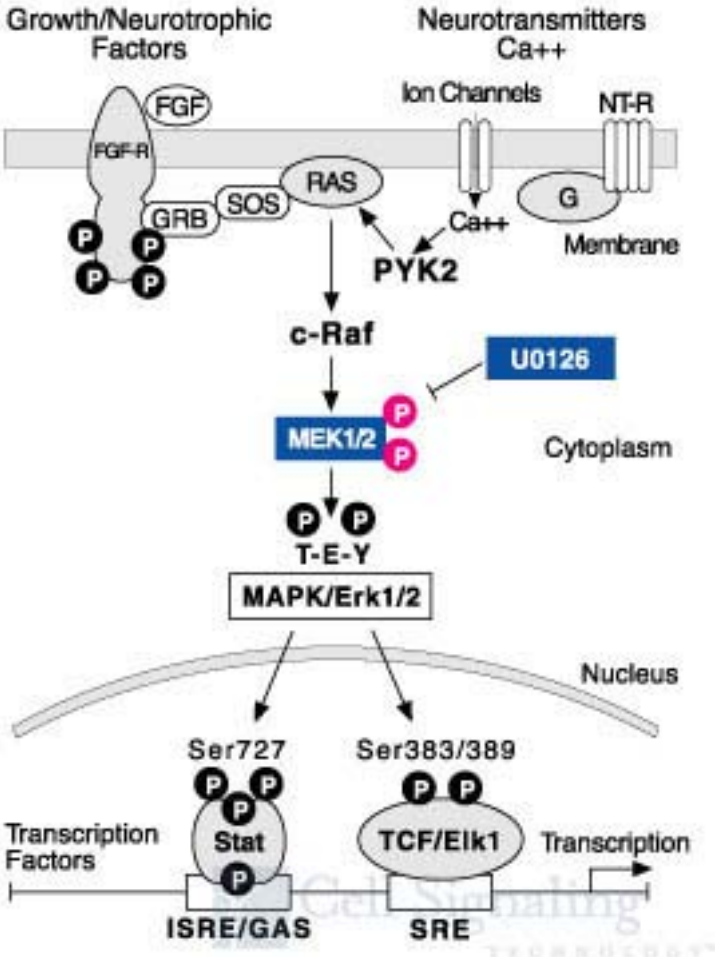

Abb. 4: Wirkungsweise von UO126
Quelle: **http://www.cellsignal.com/products/us/9903.html**
(Stand August 2001)

6. Wachstumsfaktoren

Es ist schon lange bekannt, daß in der ischämischen Retina die Anwesenheit von angiogenen Faktoren Gefäßneubildungen induzieren kann [81]. Ebenso haben experimentelle Untersuchungen am Herzen gezeigt, daß die Behandlung mit angiogenen Wachstumsfaktoren (z.B. FGFs [82,83], VEGFs [84,85] und IGFs [86,87]) die Entwicklung von Kollateralgefäßen bei langsam fortschreitender Koronarokklusion [88-91] fördert. Dies

gilt ebenfalls für die Entwicklung von Kollateralgefäßen bei länger andauernden Versuchen nach akuten Myokardinfarkten [92-94].

In Tiermodellen mit akutem Myokardinfarkt haben angiogene Wachstumsfaktoren außerdem eine Reduzierung der Infarktgröße und eine verbesserte Linksventrikuläre Auswurf-Fraktion gezeigt [92,95]. Aufgrund der kurzen Experimentdauer der meisten akuten Infarktversuchen (wenige Minuten bis wenige Stunden) und der damit zu geringen Zeit zur Entwicklung von neuen oder kollateralen Gefäßen, kann jedoch davon ausgangen werden, daß Wachstumsfaktoren außer Arterio- bzw. Angiogenese (z.B. im Zusammenhang mit Remodeling und Wundheilung [96]) noch andere Aufgaben besitzen [97]. Welcher Art diese nicht-angiogenen Eigenschaften sind und welche Mechanismen involviert sind, gilt es noch genauer zu erforschen.

6.1. Fibroblasten Wachstumsfaktoren

Zu der Gruppe der Wachstumsfaktoren zählt auch die Familie der Fibroblasten Wachstumsfaktoren. Die Fibroblasten Wachstumsfaktoren sind Zytokine und gehören zur Familie der Heparin-bindenden Polypeptide. Die Familie der Fibroblasten Wachstumsfaktoren besteht aus mindestens 21 Mitgliedern [98,99]. Es sind strukturell ähnliche Polypeptide, die ein Molekulargewicht von 16-32 kDa und eine hohe Homologie innerhalb der Familie besitzen. FGFs weisen außerdem Übereinstimmungen mit Onkogenen (z.B. FGF-5) [100] und Interleukin 1 (1 α und 1 β) auf [101].

Der saure Fibroblasten Wachstumsfaktor (acidic FGF, aFGF oder FGF-1) und der basische Fibroblasten Wachstumsfaktor (basic FGF, bFGF oder FGF-2) sind die am besten charakterisierten Mitglieder. Ihre 3-dimensionale Struktur ist seit einiger Zeit gut bekannt [101]. Zwischen FGF-1 und FGF-2 besteht eine 55%ige Aminosäuren-Sequenz-Homologie [102].

Beide wurden das erste Mal als Fibroblasten Mitogene aus dem Gehirn isoliert [103]. Später wurden sie auch in anderen Organen, wie z.B. dem Herz, gefunden [104]. Synthetisiert werden FGFs von Zellen mesodermalen und neuroektodermalen Ursprungs (z.B. Endothelzellen, Macrophagen und Myozyten). Durch Immunhistochemie wurde gezeigt, daß FGFs hauptsächlich mit der Zelle und der extrazellulären Matrix, einschließlich der von Herzmuskelzellen, assoziiert sind [105-107]. Da FGFs in vielen verschiedenen Geweben vorkommen, kann man von einer regionalen Kontrolle ausgehen.

Genauso wie das Verteilungsmuster ist auch das Spektrum der Aktivitäten von FGFs viel breitgefächerter als anfangs vermutet. Es umfaßt die Kontrolle des Zellzyklusses, die gewebespezifische Transkription und die Organogenese; ebenso

aber auch das normale Wachstum, die Differenzierung von mesenchymalen, epithelialen und neuroektodermalen Zellen, die Wundheilung und die Angiogenese [82,83]. FGFs dienen als Mitogene für eine Vielzahl von Zellen, die aus dem Mesoderm und dem Neurectoderm abstammen, einschließlich Endothel, glatter Gefäßmuskelzellen, Glia-Zellen und Neuronen [98,108], zusätzlich zu embryonalen und neonatalen ventrikulären Herzmuskelzellen [109].

Für diese Arbeit ist von Belang, daß bereits in verschiedenen Studien, sowohl ein kardioprotektiver, als auch ein angiogener Effekt der FGFs nachgewiesen werden konnte [10,13,31].

Vor allem Studien rund um FGF-1 und FGF-2 gehören zu den Hauptinteressengebieten der Abteilung von Prof. W. Schaper. Daher liegt es nahe, daß der vorliegenden Arbeit die genauere Erforschung der Wirkungsweise der kardialen Protektion von FGF-1 zu Grunde liegt. Im Weiteren werde ich daher auch nur auf FGF-1 genauer eingehen.

6.1.1. Fibroblast Growth Factor 1 (FGF-1)

FGF-1 hat viele unterschiedliche Synonyme. Die wichtigsten sind acidic FGF (aFGF), brain-derived growth factor-A (BDGF-A) und heparin-binding growth factor-1 (HBGF-1) [100]. Aufgrunddessen, daß FGF-1 in der Lage ist, die Proliferation und die verzögerte Differentierung von Myoblasten hervorzurufen, wurde er 1975 zum ersten Mal identifiziert [110]. Später wurde dieser Wachstumsfaktor aufgrund seiner Fähigkeit, die Endothelzell-Proliferation zu stimulieren, “wiederentdeckt” [111,112].

Das FGF-1 Gen des Menschen [113,114] und das der Maus [115] sind seit einiger Zeit kloniert und charakterisiert. Die Homologie zwischen dem murinen und dem humanen FGF-1 ist sehr hoch [115]. Diese Homologie macht es möglich, daß anstelle des murinen FGF-1 das humane FGF-1 in Mäusen experimentell überexprimiert werden kann und die gleiche Funktion wie murines FGF-1 ausübt.

Das FGF-1 Protein besteht in der Regel aus 140 Aminosäuren. Es wurden jedoch auch Isoforme mit 134, bzw. 136 und 155 Aminosäuren (Molekulargewicht 16-18 kDa) [116] nachgewiesen.

Im Unterschied zu den meisten anderen FGFs besitzen FGF-1 und -2 keine Signal Peptid Sequenz an ihrem 5’ Ende. Diese ist normalerweise für die Sezernierung des Proteins aus der Zelle verantwortlich. Die Art und Weise der Sekretion ist noch unklar. Einige Wissenschaftler postulieren, daß FGFs hauptsächlich aus geschädigten, bzw. verwundeten Zellen freigesetzt werden, die nicht notwendiger-

weise zugrunde gehen müssen. Dies kann durch einfache Zell-Lysis, holokrine Sekretion oder durch Freisetzen in unlöslicher Form stattfinden. Die Art und Weise wie dies geschieht, ist ebenfalls noch nicht vollständig geklärt [100].

FGF-1 hat viele verschiedene Funktionen. Für uns ist er vor allem interessant, weil er mitogen aktiv ist und somit sowohl die Zellproliferation, als auch die Zelldifferenzierung und -migration kontrolliert [100]. Desweiteren nimmt er Einfluß auf die frühe Embryonalentwicklung. Hier ist er z.B. an der Regulation der Genexpression in der fetalen Herzmuskelzelle beteiligt [109,117]. Untersuchungen haben ergeben, daß FGF-1 im humanen Herzen sowohl mit als auch ohne Ischämie vorkommt [105].

FGF-1 wird als "angiogener Faktor" bezeichnet, da er sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Gefäßneubildung induzieren kann [118]. In verschiedenen tierexperimentellen und klinischen Studien ist bereits ein angiogener sowie ein kardioprotektiver Effekt nachgewiesen worden [10,31]. Weiterhin ist FGF-1 neurotroph [119] und aktiv an der Wundheilung und Regeneration verschiedenster Gewebe beteiligt [120]. FGF-1 ist somit ein Überlebensfaktor für viele verschiedene Zelltypen.

Eine übermäßige Expression von FGFs ist mit der Entwicklung von verschiedenen Pathologien, z.B. der Tumorproliferation, verbunden [121]. Es wird auch davon ausgegangen, daß Tumore selbst Wachstumsfaktoren freisetzen, da sie von der Gefäßneubildung abhängig sind [122-124].

6.2. FGF-Rezeptoren und Signaltransduktionsweg

Es existieren 4 verschiedene engverwandte FGF-Rezeptoren mit hoher Affinität (FGFR-1-4) und einer Homologie von 55-72% auf Protein Ebene [125,126]. FGFRs sind verantwortlich für die Liganden-Spezifität der FGF-Familie. FGF-1 und -2 binden an die gleichen Rezeptoren. Ihre Bindungsstellen sind auf der Zelloberfläche lokalisiert. Zellgebundenes FGF-1 und -2 wird, abhängig vom Zelltyp, langsam internalisiert. Im Gegensatz zu anderen Mitogenen werden FGFs nicht von der Zelle abgebaut [100].

Aus experimentellen Studien ist bekannt, daß der kardioprotektive Effekt von FGF-1 und -2 rezeptorvermittelt ist. Im Gegensatz hierzu ist die Aufnahme von FGF in den Zellkern rezeptorunabhängig [10]. Suramin, ein nichtspezifischer FGF-Antagonist, verhindert die Bindung verschiedener Wachstumsfaktoren an ihre Zell-Oberflächen-Rezeptoren und kann hierdurch im experimentellen Setup die protektive Wirkung von FGF be-, bzw. verhindern [127]. Aus diesem Grund liegt es

nahe, daß der FGF-Signalübertragungsweg ein geeignetes Ziel für Therapieansätze im Bereich der Angiogenese darstellt.

Um die Signalkaskade der ischämischen Präkonditionierung auszulösen, muß der Wachstumsfaktor an seinen transmembranösen Rezeptor auf der Zelloberfläche der Zielzelle binden. Daraufhin katalysiert der intrazelluläre Teil des Rezeptors die Produktion von Molekülen, die als intrazelluläre Signale funktionieren. Im Zytosol werden hierdurch verschiedene Kinasen aktiviert (=phosphoryliert). Auf diese Art und Weise wird der Stimulus an den Zellkern weitergegeben, woraufhin dort verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert werden [128].

Im Zellkern werden zwei verschiedene Arten von Genen in ihrer Expression beeinflußt, die "frühen" und die "verzögerten" Antwortgene. Die Bildung der "frühen Antwortgene" (z.B. myc, fos und jun Protooncogene) wird innerhalb von 15 Minuten nach Wachstumsfaktorbehandlung ausgelöst, wobei hierzu keine Proteinsynthese nötig ist. Im Gegensatz dazu ist für die Aktivierung der "verzögerten Antwortgene" eine Proteinsynthese nötig. Die Induktion dieser Gene erfolgt erst nach ca. 1 Stunde. Es wird vermutet, daß die Expression der "verzögerten Antwortgene" durch Produkte der frühen Genantwort reguliert wird. Einige dieser Produkte sind als "Genregulierende Proteine" bekannt (z.B. cdk Proteine und mehrere Zykline) [128].

Die durch Wachstumsfaktoren ausgelöste Genexpression kann nicht zeitlich unbegrenzt aufrechterhalten werden. Selbst bei einer längeren Behandlung mit Wachstumsfaktoren sinkt die Expression der Gene wieder ab [128].

7. Gentherapie und genmanipulierte Mäuse

Um genomisch bedingte Erkrankungen nachzuahmen, wurden in den letzten Jahren viele neue Mäusestämme mit verändertem Genom erschaffen [41]. Es handelt sich hierbei entweder um transgene oder um knock-out (-/-) Mäuse. "Transgene Tiere tragen im Keimzellgenom DNS-Sequenzen, die experimentell übertragen wurden. Die Sequenzen ("Transgene") können Abschnitte genomischer DNS sein oder Genkonstrukte, die aus regulatorischen und kodierenden Bereichen unterschiedlicher Gene zusammengesetzt sind. Darunter fallen auch aus transfizierten Zellinien erzeugte Tiere." (Zitat GV-SOLAS). Bei knock-out Tieren wurden ein oder mehrere Gene inaktiviert. Als "Wildtyp-Tiere" werden die nicht-transgenen Wurfgeschwister bezeichnet [41].

Bisher wurden schon verschiedene transgene und knock-out FGF- oder FGF-Rezeptor-Mäuse in der Literatur beschrieben. So haben z.B. Studien mit Rezeptor-

knock-out-Mäusen gezeigt, daß FGFR-1 und -2 in der frühen Entwicklung [129-133] und FGFR-3 in der Skelett-Morphogenese [134,135] eine wesentliche Rolle spielen. FGFR-1 -/- Mäuseembryonen z.B. zeigen schwere Wachstumsdefekte und sterben vor oder während der Gastrulation. Dies ist der Nachweis, daß FGFR-1 notwendig ist für die embryonale Stammzellproliferation und die axiale Organisation [133].

Mäuse, bei denen einzelne FGFs nicht mehr funktionsfähig waren, zeigten einen unterschiedlichen Phänotyp. Die Auswirkungen reichten von früher embryonaler Lethalität bis hin zu einem sehr milden Phänotyp. Dies reflektiert das große Wirkungsspektrum der FGF-Liganden Familie und ihre spezifische Expression in verschiedenen Geweben [120]. Daß sowohl FGF-1 als auch FGF-2 nicht zwingend lebensnotwendig sind, beschreiben Studien, wobei sowohl FGF-1 -/- als auch FGF-1/-2 doppel-knock-out-Mäuse lebensfähig sind und einen sehr milden Phänotyp zeigen. Beide Mäuselinien weisen normales Wachstum und Fruchtbarkeit auf [120].

III. MATERIAL

1. Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien in p.A.-Qualität (von höchstem Reinheitsgrad) bezogen.

Steriles und pyogenfreies Wasser (H_2O), Calciumchlorid-Lösung 25 mM und Natriumchlorid-Lösung 0,9% von BRAUN MELSUNGEN, Melsungen.

Ammoniak 25% (NH_3), Magermilchpulver und Wasserstoffperoxid 30% (H_2O_2) von FLUKA, Buchs (Schweiz).

Calciumchlorid ($CaCl_2$), Eichlösung für pH-Meter, Formalin (Formaldehyd 40%) (HCHO), Glycerin 87%, HEPES, Natriumazid (NaN_3) und Natriumdodecylsulfat (SDS) von MERCK, Darmstadt.

Azeton (CH_3COCH_3), Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na_2HPO_4), Essigsäure 100% (CH_3COOH), Ethanol 96% (C_2H_5OH), Glyzin, Kaliumchlorid (KCl), Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4), Methanol (CH_3OH), Natriumcarbonat ($NaCO_3$), Natriumchlorid (NaCl), Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$) und Salzsäure 1 N (HCl) von ROTH, Karlsruhe.

Ammoniumpersulfat (APS) und TEMED (N.N.N'N',-Tetramethylethylen diamid) von SERVA, Heidelberg.

Dithiothreitol (DTT), EDTA, EGTA, Glucose, Natriumfluorid (NaF), Phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF), Polyoxyethylensorbitan-monolaurat (Tween 20), Ponceau-Färbereagenz, Propidiumiodid, sodium orthovanadate, Thioflavin S und Tris von SIGMA, München.

2. FGF-1 transgene Mäuse

Die Mäuse entstammten der eigenen Nachzucht. Die Konstrukte wurden in Mäusen des CD2F1 Stamms plaziert. Nicht-transgene Wurfgeschwister dienten als Kontrolle.

Stamm	Linie	Konstrukt
CD2F1	Linie 1	CMV/MLC2v/hFGF-1/sv40
	Linie 2	CMV/MLC2v/hFGF-1/sv40
	Linie 7	MLC2v/hFGF-1/sv40

3. Operationszubehör

Die Operationsinstrumente stammten entweder von AESCULAP (Tuttlingen), FMI (Heidelberg) oder MEDICON (Tuttlingen).

Die Spritzen und Nadeln wurden entweder von BECTON-DICKINSON (Alphen aan de Rijn, NL) oder von BRAUN MELSUNGEN (Melsungen) erworben.

Alle Nahtmaterialien wurden von ETHICON (Norderstedt) bezogen.

Sowohl die Wärmeplatte mit dem dazugehörigen Rektalkatheter als auch die EKG-Elektroden und der dazugehörige EKG-Verstärker, wurden von FMI (Seeheim) erworben.

Die "Aortic mini-flow probe" und das dazugehörige Aufzeichnungsgerät Skalar MDL400 wurden von SKALAR (Delft, NL) gekauft.

Artikel	Firma	Ort
Betaisadona®-Lösung	Mundipharma	Limburg (Lahn)
Druck Umwandler (156PC 156WL)	Honeywell	Amsterdam, NL
Millar Tip-Katheter (1.4 French)	Millar Instruments	Houston, Texas, USA
OP-Mikroskop (Leica MZ8)	Leica	Bensheim
OP-Mikroskop (Leica M690/MS-C)	Leica	Bensheim
Polyethylen-Plastikschlauch	SIMSPortex	Hythe, Kent, UK
Rasierer GT 104/GH 204	Aesculap	Tuttlingen
Small animal ventilator CIV-101	Columbus Instruments	Ohio, USA
Sterile Schwämmchen	FST	Heidelberg

4. Pharmaka

Handelsname	Wirkstoff	Firma	Ort
Kadmium Chlorid	Kadmium Chlorid	MERK	Darmstadt
Ketamin® 10%	Ketaminhydrochlorid	MEDISTAR	Holzwickede
Liquemin® N 25000	Heparin	ROCHE	Mannheim
Nembutal®	Pentobarbital	CEVA	Libourne, F
Nitroprusside	Na-Nitroprusside	ACROS	Geel, B
UO126	1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis [2-aminophenyl-thio]butadiene	PROMEGA	Heidelberg
Xylazin® 2%	Xylazinhydrochlorid	MEDISTAR	Holzwickede

5. Histologie und Planimetrie

5.1. Antikörper

Akt. Kaspase 3	PHARMIGEN	San Diego, CA, USA
Anti-Maus IgG	amersham pharmacia biotech	Roosendaal, NL
StreptABC^{HRP}	DAKOPATTS	Glostrup, DK
BS-I (Iso-Lectin B4) L2140	SIGMA	München
DAB	DAKO	Carpinteria, USA

5.2. Geräte

Das Mikroskop (DM-RB) und die dazugehörigen Filter, stammen ebenso wie die Kleinbildkamera (DMLD), von LEICA (Bensheim).

Entwässerungsmaschine Tissue-tek®VIP	MILES	Elkhart, USA
Kryostat 1720 Digital	LEITZ	Wetzlar
Paraffinschneidegerät (Reichert-Jung 2040)	Leica	Bensheim

5.3. Färbungen

Anilion Blau	Clacton-on-Sea	Essex, UK
Azokarmin	Pharbil B.V.	Rotterdam, NL
Eosin	Klinpath	Duiven, NL
Hämatoxylin	Klinpath	Duiven, NL
Orange G	MERCK	Darmstadt
Phosphor-Wolframsäure	MERCK	Darmstadt
Sirius red F3Ba	POLYSCIENCES	Northampton, UK
Xylol	Haasrode Researchpark	Leuven, B

5.4. Sonstiges

Die Objektträger sowie die Deckgläser wurden von MENZEL-GLÄSER (Braunschweig) bezogen.

Entellan	MERCK	Darmstadt
Farbfilm Fujicolor Superia 400	FUJI	
Kryostat-Messer (Modell 819)	Leica	Bensheim
2-Methylbutan	BDH / GPR	Poole, UK
Paraffin-Messer (Modell R35)	Feather / Pfm	Köln
Pepsin	BÖHRINGER	Mannheim
Quecksilber-Lampe	OSRAM / PHILIPS	
Tissue Tek® OCT Compound	MILES	Elkhart, USA

6. Hard- und Software

Adobe Photoshop D1-4.0	ADOBE	
Excel und Word	MICROSOFT	
MicroPhoto DMLD 4.05 Programm	Leica	Bensheim
NIH-Image 1.62	NIH	USA
Nikon Film Scanner LS-1000, 35mm	NIKON	Düsseldorf
PowerLab/8s	ADInstruments	Hastings, UK
Power Macintosh 7200/90	APPLE COMPUTER	
Quantimet Leica 570	LEICA	Ede, NL
SigmaStat 2.03	Jandel Corporation	Erkrath

7. Western Blot Analyse

7.1. Antikörper

Primärantikörper	Sekundärantikörper
polyklonaler Anti-phospho-p44/42 MAPK New England Biolabs Schwalbach (Taunus)	Peroxidase markiertes Goat-Anti-Rabbit IgG amersham pharmacia biotech Freiburg

7.2. Geräte

Elektrophoresekammer (Mini ProteanII™)	BioRad	München
Entwicklungsanlage Medicine 260	DÜRR-MED	Langen
Rollinkubator (Assistant RM5)	Karl Hecht GmbH	Sondheim
Schüttler MTS4	IKA Labortechnik	Staufen i. Br.
SemiDry Electroblotter	IKA Labortechnik	Staufen i. Br.
Spektrometer (Ultrospec plus)	LKB Biochrom	Freiburg
Teflon-Glas Homogeneiser	BRAUN	Melsungen
Wasserbad	GFL	Burgwedel

7.3. Sonstiges

BCA-Testsystem	PIERCE	Rockford, Illinois, USA
ECL 1+2 Lösung und Hyperfilm ECL	amersham pharmacia biotech	Freiburg
Vorgefärbte Markermoleküle Bench Mark (lifetech)	INVITROGEN	Karlsruhe

8. Allgemeine Puffer und Lösungen

TBS 10x	0,5	M	Tris		
	1	M	NaCl		pH 7,2
PBS 10x	80	g	NaCl		
	2	g	KCl		
	11,5	g	Na_2HPO_4		
	2	g	KH_2PO_4	ad 1 l ddH_20	pH 7,2
PBS/Tween 10x	80	g	NaCl		
	2	g	KCl		
	11,5	g	Na_2HPO_4		
	2	g	KH_2PO_4		
	0,1	% (v/v)	Tween 20	ad 1 l ddH_20	pH 7,2
Tris/HCl	1	M	Tris		pH 7,6

HBS (11x)	88	g	NaCl		
	3,3	g	KCl		
	22	g	Glucose		
	26,2	g	HEPES	ad 1 l ddH_20	pH 7,55
HBSS (10x)	5,4	mM	KCl		
	0,3	mM	Na_2HPO_4		
	0,4	mM	KH_2PO_4		
	4,2	mM	$NaHCO_3$		
	137	mM	NaCl		
	5,6	mM	Glucose		pH 7,4

9. Spezielle Puffer und Lösungen

(1) Probenaufbereitungs	20	mM/l	Tris/HCl	
-Puffer	250	mM/l	sucrose	
	1,0	mM/l	EDTA	
	1,0	mM/l	EGTA	
	1,0	mM/l	DTT	
	0,1	mM/l	sodium orthovanadate	
	10	mM/l	NaF	
	0,5	mM/l	PMSF	pH 7.4
(2) 10%iges Trenngel	2,5	ml	Acrylamid 40%	
(gesamt: 10ml)	3,75	ml	1M Tris/HCl	
	3,46	ml	ddH_20	
	0,1	ml	10% SDS	
	0,17	ml	1,5% APS (w/v)	
	22,5	μl	TEMED	pH 8,8
(3) 5%iges Sammelgel	0,625	ml	Acrylamid 40%	
(gesamt: 5ml)	0,625	ml	1M Tris/HCl	
	3,5	ml	H_20	
	0,05	ml	10% SDS	
	0,19	ml	1,5% APS	
	7,5	μl	TEMED	pH 6,8

(4) Probenpuffer reduzierend	50	mM	Tris/HCl		
(Lämmli-Mercapto-Puffer)	5	%	SDS		
	20	%	Glycerin		
	100	mM	DTT		pH 6,8
(5) Elektrophorese-	80	mM	Glycin		
Laufpuffer	10	mM	Tris		
	0,04	%	SDS	ad 1 l ddH_2O	pH 8,3
(6) Blot-/Transferpuffer	20	mM	Tris		
	150	mM	Glycin		
	20%	(v/v)	Methanol	ad 1 l ddH_2O	

IV. METHODEN

Für die vorliegende Arbeit wurden Tierexperimente an der Maus entsprechend den Vorschriften der Tierschutzverordnung durchgeführt. Alle Mäuse wurden in genormten Käfigen gehalten und bekamen Futterpellets und Wasser ad libidum. Arbeiten, die in unserem Hause durchgeführt wurden, sind vom Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt worden (Genehmigungsnummer B2-102).

Für die Arbeiten in Zusammenarbeit mit dem "Cardiovascular Research Institute Maastricht" (CARIM), Abteilung Kardiologie, Maastricht, Niederlande, sind ebenfalls Genehmigungen von der Tierethischen Kommission (DEC) eingeholt worden (DEC-Nr. 99-02).

Die Auswertung der Experimente wurde jeweils von ein und derselben Person ohne Kenntnis des Ursprungs der Proben durchgeführt. Hierdurch wurden unterschiedliche Auswertungen durch verschiedene Beobachter vermieden. Bei stichprobeweiser doppelter Auswertung, durch den gleichen oder einen anderen Beobachter, wurden keine nennenswerten Unterschiede festgestellt.

1. Transgenes Tiermodell

Um die Auswirkungen einer permanenten Überexpression des Fibroblasten Wachstumsfaktors FGF-1 auf die Herzgefäßanatomie und die Infarktentwicklung zu untersuchen, wurden transgene Mäuse, die das humanen FGF-1 (hFGF-1) im Herzen überexpremieren, konstruiert [136]. Auf ihre erfolgreiche Generierung und ihren histologischen Phänotyp wird im Anhang näher eingegangen.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit männlichen und weiblichen transgenen Mäusen gearbeitet. Aufgrund der zwei unterschiedlichen Konstrukte handelte es sich bei Tieren der Linie 1 (L1) und Linie 2 (L2) um CMV/MLC2v/hFGF-1/SV40-polyA und bei denen der Linie 7 (L7) um MLC2v/hFGF-1/SV40-polyA. Als Kontrollen dienten jeweils nicht-transgene Wurfgeschwister (Wildtyp-Tiere) gleichen Alters. Welches Geschlecht und welche der drei transgenen Linien verwendet wurden, wird in jedem Kapitel zu Anfang besprochen.

Alle Tiere, die für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente benutzt worden sind, waren aus der vierten oder höheren Generation. Im Alter von 4-5 Wochen wurde jedes Tier genotypisiert und mit einem kodierten Ohrclip versehen. Die Genotypisierung wurde in Bad Nauheim freundlicherweise von Frau Claudia Ullman und in Maastricht von Herrn Ronald Bronsaer durchgeführt.

2. Kurzzeit-Ischämiemodell

Um zu ermitteln, ob eine kardiale Überexpression von FGF-1 einen Einfluß haben würde auf die Infarktentwicklung und den Blutdruck, wurden transgene und Wildtyp-Tiere einer kurzzeitigen akuten Okklusion der linken Koronararterie mit nachfolgender Reperfusion ausgesetzt.

Zur genaueren Untersuchung des Signaltransduktionsweges wurden zusätzlich noch immunologische Untersuchungen und Ischämieversuche mit dem MAPKinase-Hemmer UO126 durchgeführt.

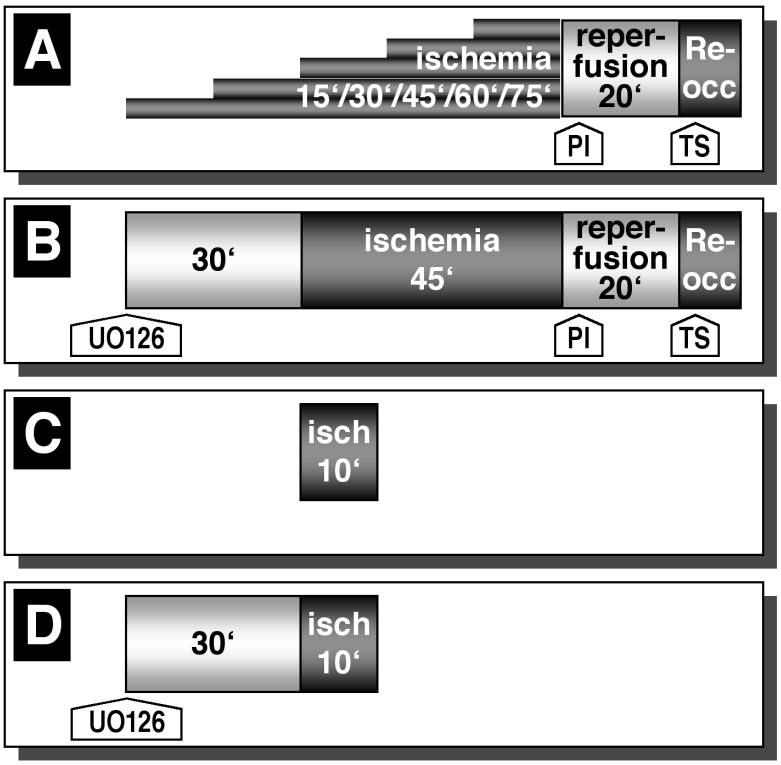

Abb. 5: Protokoll der Kurzzeitischämie-Experimente
***A**) Nach Okklusion der linken Koronararterie für 15-75 Minuten wurde die Arterie 20 Minuten lang reperfundiert und hiernach erneut verschlossen. Zur Identifizierung des Infarktgebietes und des Risikogebietes wurden zu Beginn der Reperfusion Propidium Iodid und direkt nach erneutem Verschluß Thioflavin S injiziert. **B**) In einem zweiten Protokoll im Zusammenhang mit der Hemmung der MAPKinasen wurden 30 Minuten vor einer 45 minütigen Ischämie entweder UO126/KHB/DMSO oder nur KHB/DMSO injiziert. Dies wird ausführlich in Kapitel 2.4.2 beschrieben. Myokardiale Biopsien wurden entweder nach 10 minütiger Ischämie (**C**) oder nach vorhergehender UO126/KHB/DMSO Injektion entnommen (**D**). Näheres ist in den Kapiteln 2.4.1 und 2.4.2 nachzulesen.*

2.1. Infarktinduzierung

In diesem Versuchsmodell wurden 53 adulte transgene männliche Mäuse (L1: n=20, L2: n=13, L7: n=20) und als Kontrolle 19 adulte nicht-transgene Wurfgeschwister verwendet. Das Alter der Tiere betrug 12-14 Wochen. Zum Zeitpunkt des Versuches wogen die Tiere durchschnittlich 25-30 Gramm.

Die Narkose wurde durch eine intra peritoneale Kombinations-Injektion, bestehend aus 0,1 mg/g Körpergewicht Ketaminhydrochlorid (Ketamin® 10 % (m/v)) und 0,02 mg/g Körpergewicht 5.6-dihydro-2-(2.6-xylidino)-4H-1.3-thiazine hydrochlorid, bzw. Xylazinhydrochlorid (Xylazin® 2 % (m/v)), eingeleitet. Die Phase der chirurgischen Toleranz trat nach ungefähr 5 Minuten ein und hielt ungefähr 35 Minuten an. Bei längerer Versuchsdauer wurde jeweils nach Bedarf nachdosiert.

Die Operationstechnik wurde bereits 1995 von Michael und Mitarbeitern beschrieben [18] (Abb. 6). Bei den von mir durchgeführten Versuchen fanden jedoch geringe Modifizierungen statt.

Nach Wirkungseintritt der Narkose wurde die linke Thoraxhälfte der Maus rasiert. Die Maus wurde mit dem Rücken auf eine selbstregulierende Wärmeplatte gelegt und der Oberkiefer mit einem um die Platte gespanntem Gummiband fixiert. Zur Kontrolle der Körpertemperatur wurde ein Rektalkatheter in den Anus der Maus eingeführt. Mit einem Rückkopplungssystem wurde dafür gesorgt, daß die Körperinnentemperatur der Maus relativ konstant auf 37,5°C gehalten wurde. Danach wurde der Unterkiefer angehoben und die Trachea mit einer stumpfen Metallkanüle (19 Gauge) intubiert. Das craniale Ende der Kanüle wurde über einen Plastikschlauch mit einem volumengesteuerten Beatmungsgerät verbunden. Je nach Größe des Tieres wurde die Maus initial mit einem Volumen von ungefähr 0,75 μl mit einer Frequenz von 90 Zügen pro Minute und einem Verhältnis von 1:2 (Inspiration/Exspiration) beatmet. Hiernach wurden die Arme und Beine der Maus mit Klebestreifen auf der Wärmeplatte fixiert. Um einen besseren Zugang zum Herzen zu ermöglichen, wurde das rechte Bein über das linke Bein geklebt.

Um die Unterschiede zwischen Okklusion, Reperfusion und Reokklusion aufzuzeichnen, wurde während des gesamten Versuches ein bipolares 3-Leitungs-Oberflächen-Elektrokardiogramm (EKG; entspricht der Ableitung II) geschrieben. Sowohl die Aufzeichnung als auch die Auswertung der Daten erfolgte mit dem PowerLab/8s und einem Power Macintosh 7200/90 Computer.

Anhand des EKGs läßt sich eine sichere Aussage machen, ob eine koronare Okklusion erfolgreich war oder nicht. Typischerweise zeigt sich bei einer Okklusion eine sofortige R-Zacken Erhöhung, die gefolgt ist von weiteren spezifischen EKG-Veränderungen [137,138].

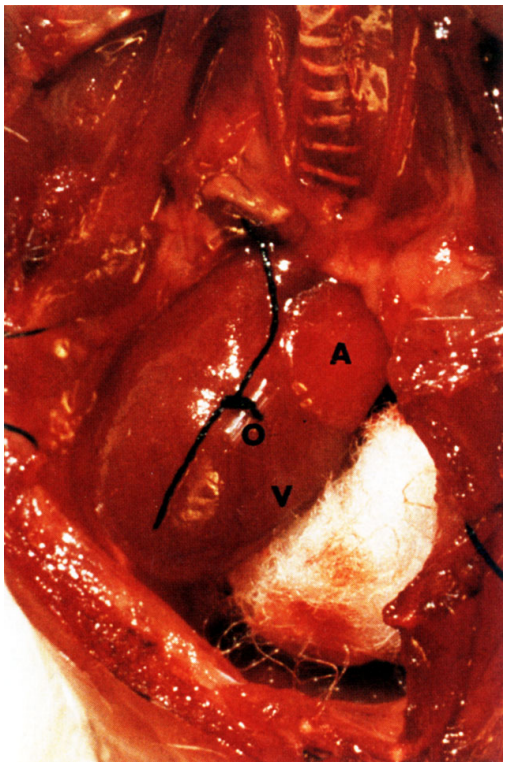

Abb. 6: Fotografie einer Maus mit eröffnetem Thorax und Okklusion der linken Koronararterie. ***A****: Linkes Atrium;* ***V****: freie Wand des linken Ventrikels;* ***O****: Okklusion. Quelle: L.H. Michael et al.* [18]

Zur Ableitung des EKGs wurden drei Nadelelektroden in der Maus plaziert. Eine Elektrode wurde subcutan caudal der rechten Achsel, die zweite subcutan cranial der rechten Schenkelspalte und die dritte subcutan medial der linken Körperseite angebracht.

Im Anschluß hieran wurde für die spätere Injektion der Fluoreszenzstoffe Propidium Iodid und Thioflavin S ein Katheter in der rechten Arteria carotis plaziert. Hierzu wurde die Haut rechts der Trachea eröffnet und die rechte und linke Mandibular- und Parotis-Drüsen (glandula mandibularis + glandula parotis) mit zwei feinen anatomischen Pinzetten vorsichtig separiert. Als nächstes wurde mit einer stumpfen Präparier-Pinzette die rechte Arteria Carotis freipräpariert. Cranial, medial und caudal um die freipräparierte Arteria Carotis wurde zum Spannen der Arterie jeweils ein ungefähr 10 cm langer Permahand-Seide Faden 5-0 gezogen. Mit dem cranialen Faden wurde die Arterie okkludiert und mit Hilfe einer Arterienklemme gespannt. Der caudale Faden wurde locker geknotet, ohne die Arterie zu verschließen und ebenfalls mit einer Arterienklemme gespannt, um den Blutfluß zu unterbinden. Im cranial-medialen Bereich der freipräparierten Arterie wurde mit der Gefäßschere ein kleines Loch geschnitten. Durch diese Öffnung wurde ein aus einer 22 Gauge Kanüle und 10 cm Polyethylen-Schlauch (ID 0,5 mm; OD 1,0 mm) selbst hergestellter Katheter mit aufgesetzter Spritze eingeführt. Als erste Sicherung wurde der mittlere Faden caudal der Gefäßöffnung um die Arterie und den innenliegenden Katheter geknotet. Nach Lockerung des Zuges und

kontrolliertem Sitz des Katheters wurden auch die restlichen beiden Fäden mit der Arterie und dem Katheter verknotet. Abschließend wurde der Katheter auf der Wärmeplatte fixiert, um ein Verrutschen zu vermeiden.

Danach wurde die zuvor rasierte linke Thoraxseite mit Betaisadona®-Lösung desinfiziert. Nach einer Anpassungsphase von 20 Minuten wurde die über dem linken Thorax liegende Haut im Bereich des sichtbaren Herzschlages parallel der Rippen mit einer Hautschere eröffnet. Die darunter liegende Muskulatur wurde vorsichtig mit zwei feinen anatomische Pinzetten auseinander präpariert und, um ein Austrocknen zu vermeiden, mit einem mit Kochsalzlösung (NaCl; Raumtemperatur) benetzten Wattestäbchen befeuchtet. Die Muskelbäuche wurden mit jeweils einer Nadel-Faden-Kombination Permahand-Seide 5-0 mit C-1 Nadel durchstochen und auseinandergezogen, um einen freien Zugang zum Thorax zu ermöglichen. Die Fadenenden wurden mit Klebestreifen ebenfalls auf der Wärmeplatte fixiert. Im Bereich des vierten oder fünften Interkostalraumes wurde die Zwischenrippenmuskulatur mit einer Präparier-Schere vorsichtig eröffnet. Um einen freien Zugang zum Herzen zu ermöglichen, wurde ein Thoraxretraktor eingespannt. Um während der nachfolgenden Operation das Lungen- und Herzgewebe nicht zu verletzen, wurde ein kleines in NaCl teilweise aufgequollenes steriles Schwämmchen eingelegt. Nach genauer Orientierung wurde die linke Koronararterie 2-3 mm unterhalb des Herzohres mit einer 7-0 Prolene-Nadel-Faden-Kombination mit BV-1 Nadel umstochen. Um eine spätere Reperfusion zu ermöglichen, wurde ein ungefähr 1 mm großes Stück Polyethylen-Plastikschlauch (PE-10; ID 0,28 mm; OD 0,61 mm) auf die zu okkludierende Arterie aufgelegt und hiernach die Arterie verschlossen (Abb. 6). Um eine Austrocknung des Gewebes zu vermeiden, wurden das Schwämmchen, der Retraktor und die Muskulaturfäden entfernt, die Muskulatur mit einem mit NaCl benetzten Wattestäbchen befeuchtet und wieder übereinandergelegt. Während der gesamten Operationszeit wurde in regelmäßigen Abständen die Muskulatur immer wieder mit NaCl befeuchtet.

Für die Anfärbung des Infarktgebietes mußte das okkludierte Gefäß reperfundiert werden. Nur hierdurch ist es möglich, den Farbstoff Propidium Iodid in das infarzierte Gebiet zu bringen. Hierzu wurde nach Ablauf der vor Operationsbeginn festgelegten Ischämiephase (15, 30, 45, 60 oder 75 Minuten; Abb. 5) der Retraktor wieder eingelegt und der Gefäßverschluß eröffnet. Zu Beginn der Reperfusion wurden über den Karotiskatheter 0,125 ml Propidium Iodid 0,05 % (m/v) im Bolus injiziert. Die anschließende 20 minütige Reperfusion ist ausreichend um die Kerne der zugrunde gegangenen Zellen anzufärben [46]. Während der Reperfusion wurde der Retraktor entfernt und die Muskulatur wieder übereinander gelagert.

Zur späteren Identifizierung des Risikogebietes war es nötig, die Arterie nach vollendeter Reperfusion ein zweites Mal zu okkludieren. Hierzu wurde der Retraktor erneut eingelegt und die linke Koronararterie ein zweites Mal okkludiert indem ein neues Stückchen PE-Schlauch unter die Okklusion gelegt wurde. Zur Sichtbarmachung des noch perfundierten Gebietes wurden 0,125 ml Thioflavin S 5 % (m/v) durch den Karotiskatheter im Bolus injiziert. Hierdurch wurden die Endothelzellen der noch perfundierten Gefäße angefärbt. Zehn Sekunden später wurde das Herz für die weitere Verarbeitung entnommen.

Die Gesamtdauer der Operation betrug je nach Ischämie-Protokoll durchschnittlich 70-130 Minuten.

2.2. Infarktgrößenbestimmung

Zur Bestimmung des Risikogebietes und des Infarktgebietes wurden die beiden Fluoreszenzfarbstoffe Propidium Iodid und Thioflavin S benutzt. Das auch nach einer Okklusion noch perfundierte Gebiet (Nicht-Risikogebiet) wurde durch Thioflavin S angefärbt. Das nach erfolgter Okklusion nicht mehr perfundierte, aber noch nicht nekrotische Gebiet (Risikogebiet), wurde nicht angefärbt. Innerhalb des Risikogebietes wurden nekrotische Bereiche (Infarkte) durch eine Propidium Iodid-Färbung angezeigt (Abb. 7).

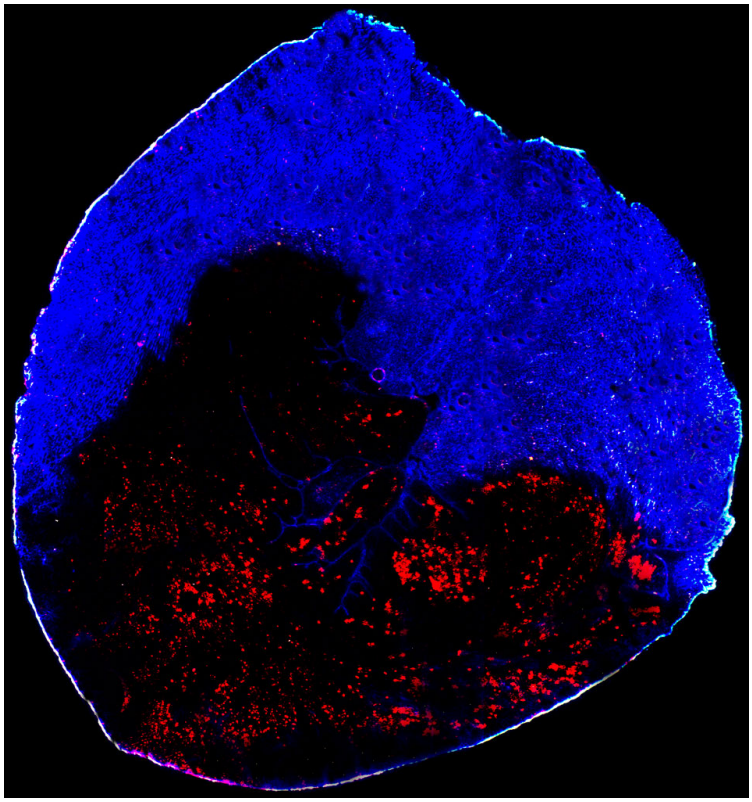

Abb. 7: Fotografie einer repräsentativen Herzscheibe mit Fluoreszenz

Das zum *in vivo* Anfärben des Infarktgebietes verwendete Propidium Iodid ist ein häufig in der Histologie verwendeter Farbstoff. Propidium Iodid kann nur in Zellen mit zerstörter Membran eindringen. Hierdurch ist Propidium Iodid-Färbung ein Indikator zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Nach Interkalation mit der DNA ist eine leuchtend rote Fluoreszenz des Zellkerns mikroskopisch sichtbar. Die Anfärbung mit Propidium Iodid geschieht innerhalb weniger Minuten und ist irreversibel. Bisher wurde in zwei Veröffentlichungen die Möglichkeit zur Infarktbestimmung nach *in vivo* Injektion von Propidium Iodid beschrieben. Anhand von Kontrollfärbungen mit Triphenyltetrazolium Chlorid und histologischen Studien wurde die Verläßlichkeit dieser Methode bewiesen [46,47].

Das zum Anfärben des noch perfundierten Gewebes benutzte Thioflavin S ist ein fluoreszierender Farbstoff, der spezifisch die Endothelzellen von Gefäßen anfärbt und nicht ins umliegende Gewebe diffundiert. Thioflavin S wird schon seit längerer Zeit für die *in vivo* Injektion und nachfolgende planimetrische Bestimmung des perfundierten Gewebes benutzt [139]. Diese Anfärbung geschieht innerhalb weniger Sekunden.

Die zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der Farbstoffe verwendeten Filter werden in Tabelle 1 genauer beschrieben.

Nach Entnahme des Herzens wurde der linke Ventrikel freipräpariert und auf 1cm x 1cm große beschriftete Korkplättchen aufgelegt. Um ein Schneiden des Ventrikels im Kryostat zu ermöglichen, wurde das Gewebe mit Tissue Tec® eingehüllt und für 30 Sekunden in gekühltem 2-Methylbutan (circa -130°C) schockgefroren. Zur Befestigung der Korkplättchen auf den beschrifteten Gewebehaltern wurde ebenfalls Tissue Tec® verwendet. Hiernach wurden die Proben zum Transport in flüssigen Stickstoff (-196°C) aufbewahrt. Für den Fall, daß die weitere Verarbeitung nicht sofort erfolgte, wurde das Gewebe bei -80°C gelagert.

Der linke Ventrikel wurde mit einer Schnittdicke von 16 μm in dem Kryostat 1720 Digital mit Einmalklingen geschnitten. Die Temperatur des Gefrierraumes betrug - 27°C, die Temperatur des Messers und des Gewebehalter betrugen -22°C. Die Gefrierschnitte wurden auf beschriftete Objektträger aufgebracht. Das Herz wurde vom Apex bis zur Basis geschnitten. Jeweils vier Schnitte in Folge wurden auf Objektträger aufgebracht und dazwischen jeweils 15 Schnitte verworfen. Durch diese Schneidetechnik wurden 10-13 Herzbereiche in regelmäßigen Abständen für die spätere Auswertung erfaßt.

Für die Darstellung der verschiedenen Gebiete (Risikogebiet, Nicht-Risikogebiet und infarziertes Gebiet) wurden, wie bereits besprochen, die Fluoreszenzfarbstoffe Propidium Iodid (PI) und Thioflavin S (TS) verwendet. Bei ultraviolettem Licht

(365 nm) und mit einem N2.1 Filter oder einem BGR-Filter waren die durch PI angefärbten Zellkerne im Fluoreszenz-Mikroskop leuchtend rot sichtbar. Bei ultraviolettem Licht (365 nm) und mit einem A- oder BGR-Filter waren die mit TS angefärbten Endothelzellen im Fluoreszenz-Mikroskop blau darzustellen.

In der Tabelle 1 sind die benutzten Leica Filterblocksysteme, bestehend aus Anregungsfiltern, dichromatischen Spiegeln und Sperrfiltern, für die entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffe aufgeführt.

Fluoreszenz ist das durch Strahlung angeregte Leuchten eines Stoffes. Die Sichtbarmachung der Fluoreszenzfarbstoffe geschieht durch Fluoreszenzanregung mit Hilfe der Auflichtmikroskopie. Das von einer Quecksilber Hochdrucklampe (50 Watt) erzeugte Licht fällt durch den Erregerfilter (=Anregungs-/Exzitationsfilter) auf einen dichromatischen Spiegel, der dieses selektiv reflektiert und auf das Präparat lenkt. Das vom Schnitt emittierte Licht, das nun eine andere Wellenlänge als das von der Lichtquelle erzeugte besitzt - es ist langwelliger, da das Licht zur Anregung Energie abgibt - passiert nun den für diese Wellenlänge transparenten dichromatischen Spiegel und den für den Fluoreszenzfarbstoff spezifischen selektiven Sperrfilter. Hiernach gelangt es im Anschluß zum Okular oder zur Kleinbildkamera. Licht anderer Wellenlänge wird reflektiert und damit nicht registriert (Abb. 8).

Tabelle 1: Spezifikation der benutzten Filter

				Licht zum Objekt	Licht zum Auge
	Filter-block	Anregungs-bereich	Anregungs-filter	Teilerspiegel	Sperrfilter
			Wellenlänge [nm]		Wellenlänge [nm]
Propidium-Iodid	N2.1	Grün	BP 515-560	RKP 580	LP 590
Thioflavin S	A	Ultraviolett	BP 340-380	RKP 400	LP 425
PI+TS	BGR	UV/Bl/Grün	BP 390-410	RKP 415	BP 455-475
			BP 495/15	RKP 510	BP 515-545
			BP 560-580	RKP 590	BP 620-660

Anregungsfilter: *Licht zum Objekt*

BP = Bandpassfilter *läßt nur das jeweils angegebene durch*
z.B.: BP 495/15 = Filterschwerpunkte+Halbwertsbreite (480-510nm)
BP 515-560 = Filterschwerpunkte+kurz- und langwellige Halbwertstelle

Teilerspiegel: *reflektiert Anregungslicht; ist transparent für Fluoreszenzlicht*

RKP = Reflexions-Kurzpaßfilter *Kantenwellenlänge in nm (läßt nur längere Wellenlängen durch); z.B.: RKP 580 (läßt nur >580 nm durch)*

Sperrfilter: *Licht zum Auge, bzw. zur Kamera*

LP = Langpassfilter *Kantenwellenlänge in nm (läßt nur längere Wellenlängen durch) z.B.: LP 590 (läßt nur >590 nm durch)*

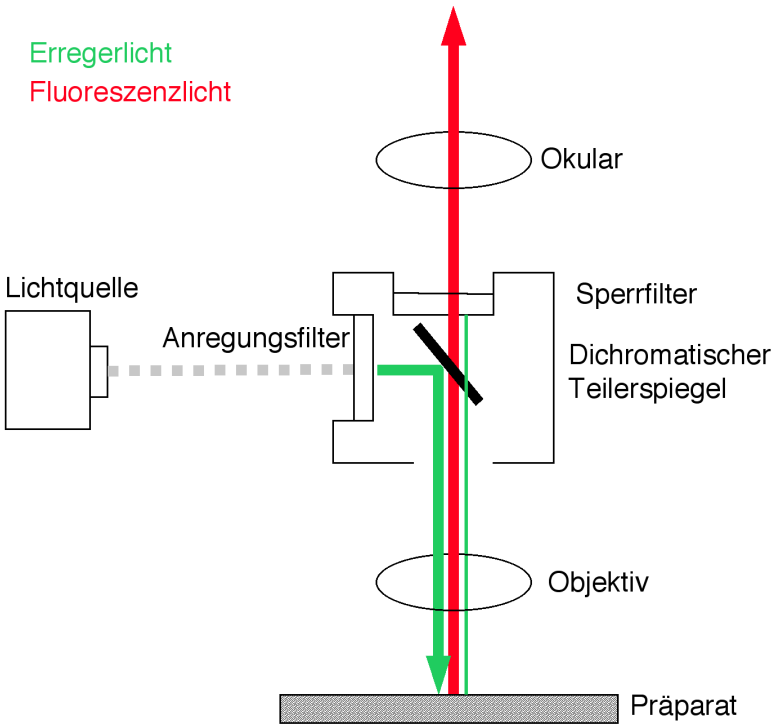

Abb. 8: Schematische Darstellung der Fluoreszenz-Auflichtanregung.
Quelle: "Leica Fluoreszenzmikroskopie" Leica, Wetzlar; Bestellnr. 913890, Stand 2000

Die bei der Färbung verwandten Fluoreszenzfarbstoffe besitzen spezifische Anregungs- und Emissionsspektren, so daß die Kombination Anregungsfilter, Teilerspiegel und Sperrfilter entsprechend gewählt werden muß.

Für die vorliegende Arbeit wurde mit einem DM-RB Mikroskop mit Fluoreszenzeinrichtung der Firma Leica und der dazugehörenden Fotoeinrichtung (Leica-Kleinbildkamera; MicroPhoto DMLD 4.05 Programm, Leica) gearbeitet. Bei den Objektiven handelte es sich je nach Herzscheibengröße um Fluoreszenzobjektive mit 1,6 facher, 2,5 facher, 5 facher und 10 facher Vergrößerung. Durch die eingesetzten Okulare mit einem Vergrößerungsfaktor 8x, errechnet sich eine Gesamtvergrößerung von 4- bis 25-fach (Tab. 2).

Tabelle 2: Vergrößerungsskala

Objektiv	**numerische Apertur**	**Okular**	**Sammel-linse**	**Gesamt-vergrößerung**
1,6x	0,05	8x	0,32x	4x
2,5x	0,07	8x	0,32x	6,25x
5x	0,12	8x	0,32x	12,5x
10x	0,30	8x	0,32x	25x

Die fotografische Dokumentation erfolgte mit dem Fujicolor Farbfilm Superia 400. Die Belichtungszeit wurde von dem Computerprogramm automatisch bestimmt und lag je nach Intensität zwischen 15 und 120 Sekunden.

Die Farbnegative wurden mit einem Nikon 35 mm Film Scanner LS-1000 und dem Programm "Adobe Photoshop® D1-4.0" in den Computer eingelesen. Die Auswertung erfolgte mit dem NIH-Image 1.62/fat Programm. Die Flächen des linken Ventrikels (LV), des blauen Nicht-Risikogebietes (nicht ischämisch, NRA: non risk area), des ungefärbten Risikogebietes (ischämisches, aber nicht nekrotisches Gebiet, RA: risk area) und des roten Infarktgebietes (nekrotischer Bereich, IA: infarct area) wurden bestimmt und die Flächengrößen gespeichert. Pro Herz wurden mindestens zehn Schnitte analysiert. In dem Excel-Programm erfolgte die weitere Auswertung bezüglich der Verhältnisse von Risikogebiet-linker Ventrikel (RA/LV), Risikogebiet-Infarktgebiet (RA/IA) und Infarktgebiet-linker Ventrikel (IA/LV). Zur Verdeutlichung ist in Abbildung 7 eine repräsentative Herzscheibe dargestellt.

2.3. Blutdruckmessungen

In diesem Versuchsmodell wurden 17 adulte transgene männliche Mäuse (L1: n=6, L2: n=4, L7: n=7) und als Kontrolle 7 adulte nicht-transgene Wurfgeschwister verwendet. Das Alter der Tiere betrug 12-14 Wochen. Zum Zeitpunkt des Versuches wogen die Tiere durchschnittlich 25-30 Gramm.

Die Narkose wurde bereits unter Punkt 2.1 beschrieben. Die verwendete Operationstechnik unterscheidet sich nur geringfügig von der unter 2.1 beschriebenen. Für die Blutdruckmessung wurde jedoch die Arteria Carotis mit einem 1,4 French Millar Tip-Katheter kanüliert. Der Katheter wurde bis in die Aorta geschoben. Der Blutdruck wurde genauso wie das EKG den ganzen Versuch über mit dem PowerLab/8s und einem Power Macintosh 7200/90 Computer aufgezeichnet. Hierdurch konnte direkt beim Vorschieben der Sonde festgestellt werden, wann sich der Katheter in der Aorta, bzw. in dem linken Ventrikel befand. Nach kontrolliertem Sitz des Katheters wurde der Katheter fixiert, um ein Verrutschen zu vermeiden.

Nach einer Anpassungsphase von 20 Minuten wurde wie ebenfalls bereits unter 2.1 beschrieben der Thorax eröffnet. Im Unterschied zu dem Ischämie-Reperfusions Protokoll wurde die Arterie jedoch direkt, also ohne das PE-Stück, okkludiert. Die ischämische Phase wurde 30 Minuten lang aufgezeichnet. Danach wurde das Tier durch kapitale Dislokation getötet.

Mit Hilfe des PowerLab/8s-Programms wurden die Blutdruckwerte für die Systole, die Diastole und die Herzfrequenz vor der Okklusion (Vergleichswert), direkt nach Okklusion und 5, 10, 15, 20, 25 und 30 Minuten nach Okklusion berechnet. Aus den Werten von Systole und Diastole wurde mit Hilfe der Formel

$$MABP = [(Systole-Diastole):3] + Diastole$$

der mittlere Blutdruck (MABP: Mean Arterial Blood Pressure) errechnet.

2.4. Signaltransduktionsweg

Zum Nachweis, daß es sich bei der Kardioprotektion in unseren Versuchen um die durch endogenes FGF-1 ausgelöste Ischämische Präkonditionierung handelt, untersuchten wir zusätzlich den der Kardioprotektion zugrunde liegenden Signaltransduktionsweg. Da in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Schaper die MAPKinasen ERK-1 und -2 von besonderem Interesse sind, entschieden wir uns, diese genauer zu studieren.

Um eine bessere Lesbarkeit des Methodenteils zu ermöglichen, wird die Zusammensetzung der Puffer, etc. im Materialteil aufgeführt werden. Im Methodenteil wird lediglich der Querverweis angegeben werden, unter dem die jeweilige Substanz im Materialteil gefunden werden kann. Dies erfolgt durch eine durchgehende, zwischen zwei Klammern gesetzte, Nummerierung.

2.4.1. Immunologische Methoden (Western-Blot-Analyse)

In diesem Versuchsmodell wurden 16 adulten transgenen männlichen Mäusen (L1: n=8, L7: n=8) und zur Kontrolle 8 Wildtyp-Mäusen nach vorausgegangener 10-minütiger Ischämie myokardiale Biopsien entnommen. Zur Kontrolle wurden von 16 adulten TG (L1: n=8, L7: n=8) und 6 Wildtyp-Mäusen Biopsien ohne Ischämie gewonnen. Das Alter der Tiere betrug 12-14 Wochen. Zum Zeitpunkt des Versuches wogen die Tiere durchschnittlich 25-30 Gramm.

Bei diesen Mäusen handelte es sich nicht um die Tiere, die zur Infarktgrößenbestimmung eingesetzt wurden.

Myokardiale Biopsien wurden nach 10 Minuten Okklusion von dem ischämischen (RA: risk area) und dem nicht-ischämischen Teil des linken Ventrikels (NRA: non risk area) oder, ohne Ischämie (Kontrolltiere), von dem linken Ventrikel (LV) entnommen. Die Proben wurden sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff (-196°C) tiefgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Für den Kinase Assay wurden die myokardiale Biopsien in einem eiskaltem Probenaufbereitungs-Puffer (1) suspendiert. Der Puffer wurde mit Salzsäure (HCl) auf pH 7.4 eingestellt. Das Gemisch wurde mit einem Teflon-Glas Homogenisator zerkleinert. Die Homogenate wurden mit 13.000 g für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände repräsentierten die lösliche (zytosolische) Fraktion. Für die nachfolgenden Schritte wurde die Fraktion in drei Portionen geteilt. Die erste Portion war für die Bestimmung der Proteinkonzentration (Western-Blot-Analyse) bestimmt, die zweite Portion war für die Gelelektrophorese von Nöten und die dritte Portion wurde für eventuelle Wiederholungen als Reserve bei -80°C aufbewahrt.

Um sicherzustellen, daß jede Westernblot-Kammer die gleiche Proteinmenge enthielt, mußte die Proteinkonzentration jeder Probe vor Einbringen in die Kammer ermittelt werden. Hierfür wurde das BCA-Testsystem der Firma Pierce verwendet. Der Test wurde nach Anweisung des Herstellers durchgeführt und die bei der Umsetzung von Bicinchoninsäure auftretende Farbreaktion im Spektrometer bei 562 nm gemessen.

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mit Modifikationen nach dem von Dr. Lämmli [140] entwickelten Verfahren unter denaturierenden Bedingungen in einer eindimensionalen, diskontinuierlichen Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Dies dient der Trennung von Proteinen in einem Molekulargewichtsbereich von 10-100 kDa. Die verwendeten Gele bestanden aus einem unteren, 10%igem Trenngel (2) und einem darüberliegenden 5%igem Sammelgel (3).

Die Proteinproben wurden zuerst mit reduzierenden Probenpuffer (Lämmli-Mercapto-Puffer (4)) verdünnt und anschließend für 5 Minuten bei 95°C im Wasserbad denaturiert. Diese Behandlung induziert eine Anlagerung stark negativ geladener SDS-Moleküle an die hydrophoben Abschnitte der Proteine. Dadurch wurde deren Eigenladung überdeckt, so daß die resultierende Gesamtladung proportional zur Molekülgröße der Proteine war. Die Verwendung des reduzierenden Agens Dithiothreitol (DTT) bewirkte das Lösen der intra- und intermolekulären Disulfid-Brücken und ermöglichte dadurch die elektrophoretische Auftrennung von Protein-Untereinheiten. Zusätzlich führte beides zur Linealisierung der Proteine, so daß ihre Laufeigenschaften im elektrischen Feld nur von der Molekülgröße abhängig waren.

Der Elektrophoreselauf (mit Elektrophorese-Laufpuffer (5)) erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA für 1 Stunde. Auf jedem Gel wurden vorgefärbte Markerproteine mit definierten Molekulargewichten aufgetragen. Hierbei handelte es sich um Bench Mark ™ prestained protein ladder. Dies sind 10 verschiedene Proteine, die Banden von 10-220 kDa aufweisen.

Für die Western-Blot-Analyse wurden die in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine nach einem Verfahren von Towbin et al. [141] in einem elektrischen Feld mit einem Transferpuffer (6) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und auf diese Weise einem immunologischen Nachweis zugänglich gemacht.

Der Erfolg des Proteintransfers im Western-Blot-Verfahren wurde durch eine reversible Anfärbung der Nitrozellulosemembran mit dem Farbstoff Ponceau S (Konzentrat 1:500 in ddH_2O verdünnt) überprüft. Nach dreiminütiger Anfärbung wurde so lange mit destilliertem Wasser (dH_20) differenziert, bis die Proteinbanden sich deutlich vom Hintergrund abhoben. Hiernach wurde die Nitrozellulosemembran zweimal hintereinander für jeweils 2,5 Minuten auf dem Rüttler mit einer Tris gepufferten Kochsalzlösung (TBS: tris buffered saline) gewaschen. Dies diente dazu, die Ponceaufärbung gänzlich auszuwaschen.

Für den immunologischen Proteinnachweis wurden zuerst unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran durch eine Inkubation in Magermilchlösungen (Blocking-Agent) (10% Magermilchpulver in TBS/Tween) bei +4°C über Nacht (ca. 16h) blockiert. Danach wurde für 5-10 Minuten mit TBS/Tween-Puffer gewaschen und anschließend der Primärantikörper (polyklonaler Anti-phospho-p44/42-MAPK-Antikörper) in einer Konzentration von 1:500 in TBS mit 3% Magermilchpulver aufgetragen.

Die Inkubation erfolgte bei +4°C für 24 Stunden im Zentrifugenröhrchen auf einem Rollinkubator. Nach einem weiteren Waschschritt wurde die Membran für 1,5 Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur wiederum auf dem Rollinkubator mit einem speziesspezifischen, peroxidasemarkiertem Sekundärantikörper (Peroxidase markiertes Goat-Anti-Rabbit Immunoglobulin G) inkubiert. Danach wurde die Membran erneut für 30 Minuten mit TBS Puffer gewaschen, anschließend mit ECL 1+2-Lösung für eine Minute angefärbt, die Lösung abgeschüttet und die Membran auf einem Filter für eine Minute getrocknet.

Zur Dokumentation von gefärbten Proteingelen und Western-Blot-Analysen wurden die Membranen in Filmkassetten mit einem Hyperfilm ECL gelegt. Von jedem Blot wurden drei Bilder angefertigt. Der erste Film wurde der Membran für 5 Minuten ausgesetzt; daraufhin wurde ein zweiter Film eingelegt, der für 10 Minuten belichtet wurde. Der dritte Film wurde über Nacht (ca. 16 Stunden) belichtet. Die Dauer der Belichtung ist abhängig von der Stärke der Reaktion. Da die Banden (leicht grünlich gefärbt und leuchtend) mit bloßem Auge kaum sichtbar sind, wurden die Filme zur Sichtbarmachung in einem Entwickler weiter bearbeitet. Zur Auswertung wurde der beste der jeweils drei Filme ausgewählt.

2.4.2. Hemmung der MAPKinasen ERK-1/-2 durch UO126

Um die Bedeutung von ERK-1 und ERK-2 bei der kardialen Protektion von FGF-1 transgenen Mäusen zu bestimmen, wurden entweder 500 µl einer Lösung des MEK Hemmers UO126 (gelöst in Krebs-Henseleit-Puffer und DMSO) oder zur Kontrolle nur Krebs-Henseleit-Puffer und DMSO in die ventrale Schwanzarterie injiziert. UO126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenyl-thio]butadiene) ist ein MEK 1/2-Inhibitor und blockiert dadurch spezifisch die Aktivierung von ERK-1 und -2 [78,79]. Die Dosierung von UO126 betrug 5 mg/kg Körpergewicht.

Zur Bestimmung der Infarktgröße bekamen 4 adulte männliche transgene (L1) und 4 adulte männliche Wildtyp-Mäuse UO126 (gelöst in Krebs-Henseleit-Puffer und DMSO) in die ventrale Schwanzarterie injiziert (UO126/KH/DMSO). Zur Kontrolle bekamen 4 adulte männliche transgene (L1) und 4 adulte männliche Wildtyp-Mäuse nur Krebs-Henseleit-Puffer und DMSO (KH/DMSO) verabreicht.

Zur Durchführung der Immunologischen Methode (Western-Blot-Analyse) bekamen 4 adulte männliche transgene (L1) und 4 adulte männliche Wildtyp-Mäuse UO126/KH/DMSO in die ventrale Schwanzarterie injiziert. Zur Kontrolle bekamen 4 adulte männliche transgene (L1) und 4 adulte männliche Wildtyp-Mäuse nur KH/DMSO verabreicht.

Das Alter der Tiere betrug 12-14 Wochen. Zum Zeitpunkt des Versuches wogen die Tiere durchschnittlich 25-30 Gramm.

Die Narkose wurde mit der bereits unter 2.1 beschriebenen Ketamin/Xylazin Kombination induziert. Nach der Narkoseeinleitung wurde den Versuchstieren entweder UO126 gelöst in KH/DMSO oder nur KH/DMSO in die ventrale Schwanzarterie injiziert. Dies erfolgte 30 Minuten vor Operationsbeginn (Abb. 5). Die Operation entspricht der unter Punkt 2.1 erwähnten.

Zur Infarktgrößenbestimmung wurde die linke Koronararterie 45 Minuten lang verschlossen, anschließend 20 Minuten lang reperfundiert und abschließend reokkludiert (Abb. 5). Zur Identifizierung der verschiedenen Gebiete wurden erneut die Farbstoffe Propidium Iodid und Thioflavin S injiziert. Die Injektion der Farbstoffe und die Auswertung erfolgte wie bereits unter 2.1 und 2.2 beschrieben.

In einem zweiten Versuchsaufbau wurden den Mäusen nach 10 minütiger Okklusion myokardiale Biopsien von dem ischämischen (RA) und dem nicht-ischämischen Teil (NRA) des linken Ventrikels entnommen (Abb. 5). Zur Kontrolle wurden von Tieren ohne vorherige Ischämie myokardialen Biopsien des linken Ventrikels (LV) entnommen. Die Proben wurden sofort nach Entnahme in Stickstoff tiefgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Die weitere Verarbeitung und Auswertung wurde bereits unter 2.2 beschrieben.

3. Langzeit-Ischämiemodell

Zusätzlich zu den Versuchen mit kurzzeitiger Okklusion der linken Koronararterie, untersuchten wir auch die Auswirkungen einer länger andauernden Okklusion des selben Gefäßes. Unser Hauptaugenmerk lag auf der Frage, ob nach einer 1 wöchigen Okklusion in den transgenen Tieren die gleichen Prozesse bezüglich Infarktgröße, Herzfunktionen und kardialer Umbauprozesse ablaufen würden wie bei den nicht-transgenen Wurfgeschwistern. Im Großen und Ganzen wurden bei diesen Langzeitversuchen die gleichen Parameter bestimmt wie bei der Kurzzeitischämie. Da die Langzeitischämie-Studie allerdings in Kooperation mit dem Cardiovascular Research Institute Maastricht (CARIM) in den Niederlanden durchgeführt worden ist, sind einige Techniken unterschiedlich und werden daher in diesem Kapitel beschrieben. Bei Übereinstimmungen mit den in Bad Nauheim durchgeführten Versuchen ist dies in den jeweiligen Abschnitten vermerkt.

Mein Dank hierfür gilt Dr. Pieter A. Doevendans und Drs. Meindert Palmen. Drs. Meindert Palmen war im Rahmen seiner eigenen Doktorarbeit maßgeblich für die Durchführung der Versuche verantwortlich.

3.1 Infarktinduzierung

In diesem Versuchsmodell wurden 17 adulte transgene männliche und weibliche Mäuse (FGF) der Linie 1 (n=8) und 2 (n=9), sowie 12 adulte nicht-transgene männliche und weibliche Wurfgeschwister (WT) verwendet. Das Alter der Tiere betrug 12-14 Wochen. Zum Zeitpunkt des Versuches wogen die Tiere durchschnittlich 25-30 Gramm.

Die Mäuse wurden in vier verschiedene experimentelle Gruppen eingeteilt: zwei Gruppen bei denen ein Infarkt (MI) gesetzt worden war (FGF/MI: n=9 und WT/MI: n=6) und zwei SHAM-Kontrollgruppen (FGF/SHAM: n=8 und WT/SHAM: n=6).

Die Mäuse bekamen 100 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital (Nembutal®) intra peritoneal injiziert. Um die Tiere nicht zu sehr zu belasten, wurde eine Nachdosierung nicht durchgeführt. Mäuse, die trotz der angegebenen Menge Narkosemittel noch weiterhin Reaktion zeigten auf Auslösung des Pedalreflexes etc., wurden aus dem weiteren Versuch ausgeschlossen.

Die Operationsvorbereitungen, die Beatmung und die linksseitige Thoraxeröffnung im vierten Interkostalraum, entspricht der unter Punkt 2.1 beschrieben. Im Gegensatz zu der Operation bei der Kurzzeitischämie, wurde die linke Koronararterie mit einem 6-0 Prolene Faden mit einer BV-1 Nadel umstochen und direkt (ohne PE-Schlauch) verschlossen. Hiernach wurden das sterile Schwämmchen sowie der Thoraxretraktor entfernt und der Thorax mit zwei oder drei Einzelheften

(Perma-Handseide 5-0; C-1 Nadel) geschlossen. Die Muskulatur wurde angefeuchtet und über die Naht gelegt. Nachfolgend wurde die Haut durch Einzelhefte (Perma-Handseide 5-0; C-1 Nadel) adaptiert.

Die Maus wurde sobald als möglich von der Beatmung genommen und bis zum vollständigen Erwachen in eine Box mit 30 %igem Sauerstoff und einer vorgegebenen Temperatur von konstant 37°C gelegt.

Zur Kontrolle wurden außerdem sogenannte ”Sham-Operationen” an transgenen Mäusen und nicht-transgenen Wurfgeschwistern durchgeführt. Sham operierte Tiere wurden der gleichen chirurgischen Prozedur unterzogen - ohne jedoch die linke Koronararterie zu umstechen und zu verschließen. Dies soll alle mit einer Operation verbundenen Veränderungen ermöglichen, ohne daß jedoch ein Herzinfarkt ausgelöst wird. Die Gesamtdauer der Operation betrug ungefähr 25-35 Minuten. Nach erfolgreicher Operation wurden die Tiere eine Woche lang unter Standardbedingungen gehalten. Abschließend wurden die Herzfunktionen bestimmt und danach die Herzen entnommen und histologisch untersucht.

3.2 Hämodynamische Messungen

Eine Woche nach dem Verschluß der linken Koronararterie wurden die Herzfunktionen bestimmt. Hierfür wurden die Tiere erneut mit Pentobarbital intra peritoneal (50 mg/kg) narkotisiert. Je ein 1 French Hitze-gezogener Katheter wurde in die linke Arteria femoralis und die Vena femoralis eingeführt. Um on-line den Blutdruck aufzuzeichnen, wurde der Arteria femoralis-Katheter mit einem Druckumwandler verbunden. Die Aufzeichnungsrate betrug 2 kHz. Dies entspricht 120.000x pro Minute. Die Tiere wurden wie bereits unter 2.1 beschrieben beatmet und die linke Brustseite oberhalb des zweiten intercostalen Zwischenraumes eröffnet. Nach Durchtrennen des darüberliegenden thymalen Gewebes, wurde die Aorta ascendenz freigelegt. Nachfolgend wurde ein Flußmessgerät um die Aorta ascendenz plaziert und mit einem Aufzeichnungsgerät verbunden. Um die Körperinnentemperatur konstant zu halten, wurde eine Wärmeplatte mit kombinierter Thermoregulierung benutzt.

Nach diesen Vorbereitungen durfte die Maus sich von den Manipulationen erholen. Nach Stabilisierung und Aufzeichnung der Grundwerte (Basalwerte) der Herz-Leistung(sfähigkeit), wurden 2,5 ml warme Kochsalzlösung (37˚C) schnell durch den Katheter in der linken Vena femoralis infundiert, um einen akuten Volumenüberschuß hervorzurufen und somit maximale Herzauswurfraten (CO: cardiac output) zu erzeugen. Die Herzauswurfraten (in Ruhe und maximal), der mittlere Blutdruck (MABP) und der periphere Gesamtwiderstand (TPR: total peripheral resistance; TPR=MABP/CO) wurden vor und nach Volumenladung

analysiert. Da weibliche und männliche Tiere untersucht worden sind, wurde der Cardiac Index (CI=Cardiac output/Body weight) errechnet, um die Unterschiede im Körpergewicht zwischen den beiden Geschlechtern zu korrigieren.

3.3. Histologie

Nach Abschluß der hämodynamischen Messungen wurden die Tiere durch eine intra venöse Infusion von 1 ml Kadmium Chlorid (0,1 Mol) getötet. Hierdurch wird das Herz in der Diastole angehalten. Das Herz und die Peripherie wurden durch das linke Atrium mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS: phosphate buffered saline; pH 7,4), versetzt mit 1 mg/ml Natrium-Nitroprusside, über einen Zeitraum von 3-5 Minuten bei einem konstanten Druck von 100 mmHg perfundiert. Hierdurch wurde versucht, das Blut so gut als möglich aus den Gefäßen zu waschen. Durch die Zugabe von Natrium-Nitroprusside wird eine gute Dilatation der Gefäße gewährleistet. Anschließend wurden die Herzen noch 3-5 Minuten lang mit einer 5 %igen Formalin®-Lösung (entspricht 2% Formaldehyd-Lösung), gelöst in PBS, perfundiert. Auch dies geschah bei 100 mmHg [142,143]. Herz, Lunge und Leber wurden schnell entnommen, gewogen und 24 Stunden lang in einer 10 %igen Formalin®-Lösung (in PBS) immersions-fixiert.

Am folgenden Tag wurde das Herz longitudinal zu dem Infarktgebiet und zur Aortawurzel geschnitten. Im Anschluß daran wurden die Herzhälften in 70%igen Alkohol gelegt und über Nacht durch eine Entwässerungsmaschine geschickt. Abschließend wurden die Herzhälften in Paraffin eingebettet.

Für die histologischen Bestimmungen wurden die Herzen mit einem Paraffin-Schneidegerät in 4 μm dicke Scheiben geschnitten und auf Adhäsions-Objektträgern plaziert.

3.3.1 Bestimmung der Morphologie

Für die Bestimmung der Infarktgrößen und der Architektur des linken Ventrikels wurden zwei mit Azan gefärbte Herzschnitte per Tier ausgewertet [142,143].

Sofern nicht anders angegeben, fanden alle Färbeschritte bei Raumtemperatur (RT) statt. Zu allererst wurden die Herzscheiben deparaffinisiert. Hierzu wurden die Objektträger jeweils 5 Minuten lang in zwei verschiedenen Xylol-Lösungen getaucht und danach jeweils 3 Minuten lang in zwei verschiedenen Tauchbecken mit 100% Ethanol belassen. Anschließend wurden die Objektträger zusätzlich jeweils 3 Minuten in 96%-igem, 70%-igem und 50%-igem Alkohol rehydriert. Zum Schluß wurden sie mit Aqua destillata gewaschen.

Durch Xylol wird das Paraffin ausgewaschen und durch den Alkohol wird das Xylol weggewaschen.

Als nächstes wurden die Objektträger 15 Minuten lang bei 56°C in Azan I (vorgewärmt auf 56°C) eingelegt. Hiernach wurden die Objektgläser mit Aqua destillata gespült und 45 Minuten in 5%-iger Phosphor-Wolframsäure belassen. Auch hiernach wurden die Objektträger mit Leitungswasser gespült. Im Anschluß daran wurden die Schnitte 10 Minuten in Azan II eingelegt. Diese war 1:3 mit Aqua destillata verdünnt. Abschließend wurden die Objektträger mit 96%-igem Ethanol gespült und dehydriert. Zur Dehydrierung wurden die Schnitte jeweils kurz in 96%-igem und 100%-igem Ethanol belassen. Abschließend wurden die Herzscheiben 2 x 2 Minuten lang in Xylol gelegt und zur Konservierung mit Entellan eingedeckelt. Hierbei wurde das Deckgläschen auf den mit Entellan bedeckten Objektträger gelegt und leicht angedrückt. Hierdurch konnten mögliche Luftblasen zum Rand hin entweichen.

Tabelle 3: Protokoll für die Azan-Färbung

Nr.	Arbeitsschritt	Reagenzien	Temperatur	Zeit
1	Deparaffinisierung	Xylol	RT	2 x 5 min
2	Xylol wegwaschen	Ethanol 100%	RT	2 x 3 min
3	Rehydrierung	Ethanol 96% Ethanol 70% Ethanol 50%	RT RT RT	3 min 3 min 3 min
4	Spülen	Aqua destillata	RT	schwenken
5	Färbung	Azan I*	56°C	15 min
6	Spülen	Aqua destillata	RT	2 min
7	Farbfixierung	Phosphor-Wolframsäure 5%	RT	45 min
8	Spülen	Aqua	RT	2 min
9	Färbung	Azan II**	RT	10 min
10	Dehydrierung	Ethanol 96% Ethanol 100%	RT RT	schwenken schwenken
11	Spülen	Xylol	RT	2 x 2 min
12	Eindeckeln	Entellan, Objektgläschen	RT	

** Azokarmin 0,5 g; Aqua destillata 100 ml; Konzentrierte Essigsäure 1 ml*

*** Anilin-Blau, wasserlöslich 0,5 g; Orange G 2 g; A.destillata 100 ml; konz. Essigsäure 8 ml*

Durch die Azan-Färbung wird das bindegewebige Kollagen blau gefärbt. Sowohl Chromatin als auch Erythrozyten und Nervengewebe erscheinen rot. Die Muskulatur wird bei einer Formalin/Paraffin-Fixierung rötlich gefärbt.

Zur Auswertung der Infarktgröße wurde eine computerisierten Methode verwendet (Quantimet 570 Leica, Niederlande; Vergrößerung 400x).

Die Größe des Infarktes wurde als prozentualer Anteil des linken Ventrikels errechnet (IA/LV). Zusätzlich wurden die Dicke des interventrikulären Septums und der freien Wand des linken Ventrikels zur Hypertrophiebestimmung herangezogen.

3.3.2. Bestimmung der Kapillardichte

Die Kapillarisierung wurde anhand von Bandeiraea Simplicifolia-I (BS-I) Iso-Lectin B4 gefärbten 4 μm dicken Herzschnitten bestimmt [144]. Durch BS-I werden spezifisch die Endothelzellen angefärbt.

Vor Durchführung der BS-I-Färbung wurden die Herzscheiben zu allererst deparaffinisiert. Hierzu wurden die Objektträger jeweils 5 Minuten lang in zwei verschiedenen Xylol-Lösungen getaucht und danach jeweils 3 Minuten lang in zwei verschiedenen Tauchbecken mit 100% Ethanol belassen.

Anschließend wurde die endogene Peroxidase durch Verbleiben der Objektträger in 0,3%-igem H_2O_2 (in Methanol) gehemmt. Hierfür waren 15 Minuten veranschlagt. Hiernach wurden die Schnitte mit PBS gewaschen.

Um ein Verdunsten der Lösungen und ein Ausbleichen zu verhindern, wurden alle weiteren Schritte in einer feuchten Kammer durchgeführt. Über Nacht wurden die Herzscheiben bei Raumtemperatur mit BS-I (1:100; in PBS) inkubiert. Am folgenden Morgen wurden die Objektträger erneut mit PBS gewaschen und zur Verstärkung des Signals 30 Minuten lang bei Raumtemperatur mit einem Peroxidase konjugiertem StreptAvidin-Biotin-Komplex (ABC^{HRP}; 1:200 in PBS) inkubiert. Hiernach wurden die Objektträger erneut mit PBS gewaschen. Zur letztendlichen Anfärbung wurden die Herzscheiben mit DAB (3,3'-diaminobenzidin-tetrahydrochlor; 1 mg/ml Lösung) (1 ml DAB + 5 μl H_2O_2) inkubiert. Hierdurch werden die Endothelzellen braun dargestellt. Sobald die Braunfärbung gut sichtbar war, wurde die Reaktion durch Abspülen mit demineralisiertem Wasser gestoppt. Auch diese Gewebeschnitte wurden wie bereits zuvor beschrieben eingedeckelt.

Als negative Kontrolle dienten Schnitte, die anstelle des Primär-Antikörpers (BS-I) nur dem Inkubationspuffer PBS ausgesetzt waren, aber auch die nachfolgenden Schritte durchlaufen hatten.

Anhand von in den Computer eingelesenen Herzscheiben (Quantimet 570; Vergrößerung 400x) wurden die kapilläre Dichte in dem interventrikulären Septum bestimmt.

Tabelle 4: Protokoll für die immunohistochemische Färbung

Nr.	Arbeitsschritt	Reagenzien	Temperatur	Zeit
1	Deparaffinisierung	Xylol	RT	2 x 5 min
2	Xylol wegwaschen	Ethanol 100%	RT	2 x 3 min
3	Hemmung end. Peroxidase	H_2O_2 0,3% (in Methanol)	RT	15 min
4	Spülen	PBS	RT	3 x 3 min
5	Inkubation	BS-I (1:100)	RT	über Nacht
6	Spülen	PBS	RT	3 x 3 min
7	Inkubation	ABC^{HRP} (1:200)	RT	30 min
8	Spülen	PBS	RT	3 x 3 min
9	Inkubation	DAB	RT	einige min
10	Stop Reaktion	dH_2O	RT	einige min
11	Dehydrierung	Ethanol 96% Ethanol 100%	RT RT	2 x 2 min 2 x 2 min
12	Spülen	Xylol	RT	2 x 2 min
13	Eindeckeln	Entellan, Objektgläschen	RT	

3.3.3. Bestimmung der Apoptoserate

Mit einem TUNEL Assay (Terminal transferase dUTP Nick End Labeling) [145] und der aktivierten Kaspase-3 Färbung wurden die Apoptose Raten in der Mitte des infarzierten Gebietes und im nicht-infarziertem Septum bestimmt. Durchschnittlich wurden 6000 Zellkerne in beiden Gebieten des Herzen gezählt. Der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen wurde ausgedrückt als die Gesamtmenge gezählter Zellkernen geteilt durch die Anzahl der TUNEL und aktivierte Kaspase-3 positiven Kerne.

Sowohl die TUNEL- als auch die aktivierte Kaspase-3 Färbung wurde am APCAM in der Abteilung Pathologie in Middelheim, Antwerpen (Belgien) von Dr. Kockx

durchgeführt. Dies liegt daran, daß die aktivierte Kaspase-3 Färbung in Maastricht nicht durchgeführt wird.

Da die TUNEL Methode sehr sensitiv ist, ist eine sorgfältige Titration sowohl der proteolytischen Vorbehandlung als auch der Tdt Konzentration nötig. Anderenfalls wird unter Umständen auch eine große Anzahl nicht-apoptotischer Zellen angefärbt. In zwei kürzlich erschienenen Veröffentlichungen wurde eine molekuläre Erklärung für dieses Phänomen beschrieben [146,147]. In diesen Publikationen wurde gezeigt, daß außer apoptotischen Zellkernen auch nicht-apoptotische Zellkerne, die Anzeichen einer aktiven Gentranskription zeigen, mit der TUNEL Technik angefärbt werden. Diese Zellen sind jedoch noch stets aktiv. Ihre Gentranskription wird in Zusammenhang gebracht mit einem entweder verwandten oder völlig unabhängigen Prozeß bezüglich des Pathways des apoptotischen Zelltodes. In den wirklich apoptotischen Zellen ist die DNS des Zellkerns in Fragmente von oligo-nukleosomaler Größe zerfallen. Außerdem kann eine Aktivierung der Kaspasen nachgewiesen werden.

Aus diesem Grund wurde für die vorliegende Arbeit zusätzlich zu der TUNEL Färbung eine aktivierte Kaspase-3 Färbung durchgeführt. Hierzu wurde ein Antikörper gegen das 17 kDa große Fragment der humanen aktivierten Kaspase-3 verwendet (Verdünnung 1:200). Zuvor waren die Herzschnitte einer Zitrat/Mikrowellenbehandlung ausgesetzt worden [143]. Als positive Kontrolle wurde Tonsillengewebe benutzt.

4. Statistische Analyse

Die Meßergebnisse werden anhand von Mittelwert ± Standardfehler (SEM: standard error of the mean) beschrieben. Zur Ermittlung von Gruppenunterschieden wurden die Computerprogramme SigmaStat für Windows bzw. GraphPad Prism für Macintosh verwendet. Zum Vergleich von drei oder mehr Gruppen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgenden multiplen Vergleichen nach Bonferroni benutzt. Bei nicht gegebenen Voraussetzungen (Normalverteilung, homogene Varianzen) wurde alternativ der Kruskal-Wallis-Test mit anschließenden multiplen Vergleichen nach Dunn eingesetzt. Waren nur zwei Gruppen zu vergleichen, kam der ungepaarte t-Test (alternativ: Mann-Whitney-Test) bzw. der gepaarte t-Test (alternativ: Wilcoxon-Test) zum Einsatz. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5% ($p < 0,05$) wurde als statistisch signifikant angesehen.

V. ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit ging es um die Frage ob transgene Mäuse mit einer kardialen Überexpression von humanem FGF-1 besser geschützt sein würden gegen sowohl kurzzeitige, als auch langzeitige kardiale Ischämie als die Wildtyp-Tiere. Hierfür wurden die Parameter "Infarktgrößenentwicklung", "Hämodynamik", "Herzfunktionen" und "Remodelling" bestimmt. Da die transgenen Tiere eine verzögerte Infarktentwicklung aufwiesen, wurde zusätzlich noch der Signaltransduktionsweg der MAPKinasen untersucht. Dieser ist unserer Meinung nach hieran zu einem überwiegenden Teil beteiligt.

Die erfolgreiche Herstellung der transgenen Mäuse und ihr histologischer Phänotyp wird im Anhang beschrieben.

Bei der Kurzzeitischämie vertraten wir die Hypothese, daß vergleichbare Resultate wie bei eine klassischen Präkonditionierung auftreten würden, während wir in den chronischen Infarkt-Versuchen v.a. ein verstärktes Gefäßwachstum (Angiogenese), sowie Veränderungen in dem Myokardumbau und verbesserte Herzfunktionen erwarteten.

1. Kurzzeitischämie

Eine erfolgreiche Okklusion der linken Koronararterie zeigte sich in deutlichen Veränderung des EKGs. Sofort nach Okklusion trat eine Erhöhung der R-Zacke auf. Wenige Sekunden nach geglücktem Verschluß war die R-Zacke 2- bis 3- fach so hoch als vor der Okklusion. Nach vergleichbaren Werten, direkt vor der Okklusion, stieg die R-Zacke in den transgenen Mäusen stärker an und blieb länger erhöht als in den Wildtyp-Tieren (* $p < 0.05$; Abb. 9A).

Während in den Wildtyp-Tieren das ST-Segment unmittelbar nach der Okklusion erhöht war, zeigten die transgenen Tiere eine verzögerte ST-Segment Erhebung. Außerdem blieb diese in den transgenen Tieren länger präsent (*$p < 0.05$; Abb. 9B).

Zusätzlich zeigte das Myokard in dem betroffenen Gebiet durch eine leicht rosarote Entfärbung im Vergleich zu dem umgebenden dunkelroten Myokard eine fehlende Blutversorgung an. Die erfolgreiche Reperfusion wurde durch Farbänderung des Myokards von weißlich zu rötlich sichtbar. Auch nach erfolgter Reokklusion waren Änderungen im EKG und in der Myokardfarbe sichtbar. Diese Veränderungen traten sowohl bei den transgenen Mäusen der Linie 1, 2 und 7 als auch bei den Kontrolltieren auf.

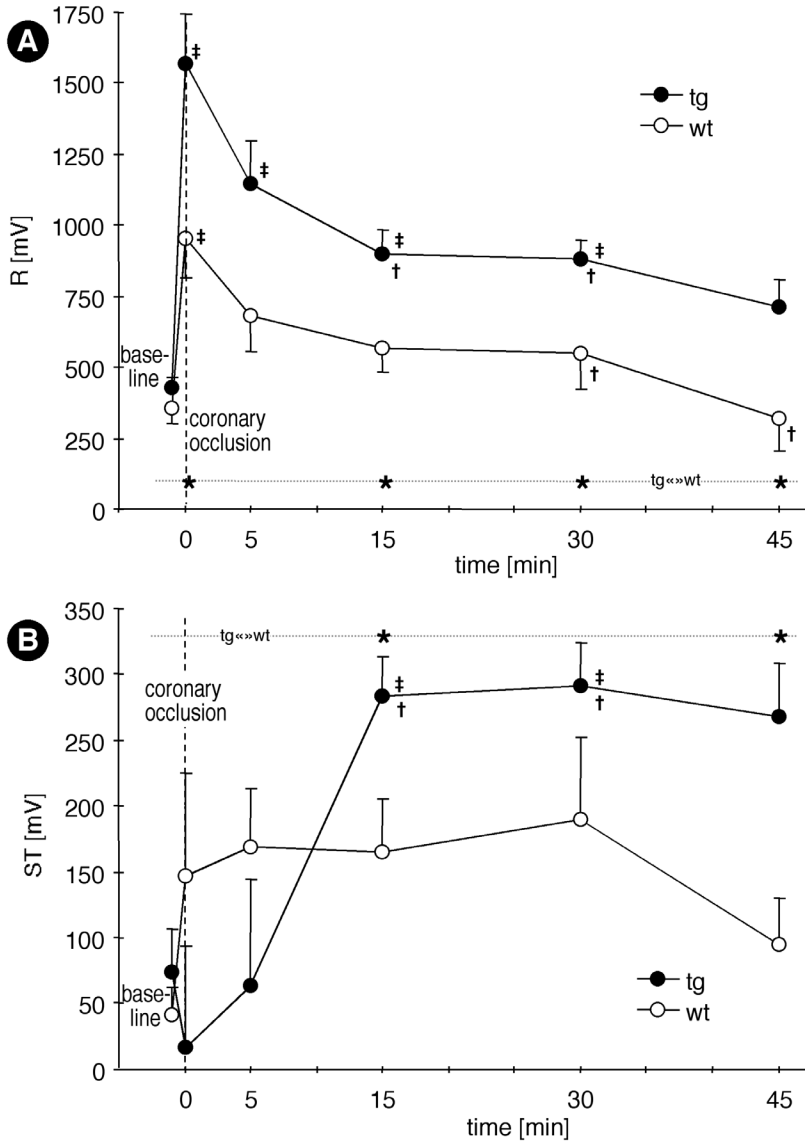

Abb. 9: Veränderungen in der R-Amplitude (A) und dem ST-Segment (B) nach einem myokardialen Infarkt

1.1. Infarktentwicklung

Abbildung 10 gibt die Verhältnisse Risikogebiet / Linker Ventrikel (RA/LV) in Wildtyp- und in transgenen Mäusen für die verschiedenen Ischämie / Reperfusion Protokolle (MI/R) wider. Die Gruppen wiesen untereinander, also unabhängig vom Genotyp und von der Okklusionsdauer, keine Unterschiede in den RA/LV Werten auf. Die Ratio RA/LV war folglich in allen Gruppen vergleichbar.

Trotz ähnlicher Risikogebiet-Größen wiesen die Herzen der Kontrollgruppen, verglichen mit den transgenen Linien, für jeden beobachteten Zeitraum signifikant höhere Infarktgebiet / Risikogebiet (IA/RA) Werte nach den jeweiligen MI/R-Zeiten auf (Abb. 11). Zwischen den drei verschiedenen transgenen Linien konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

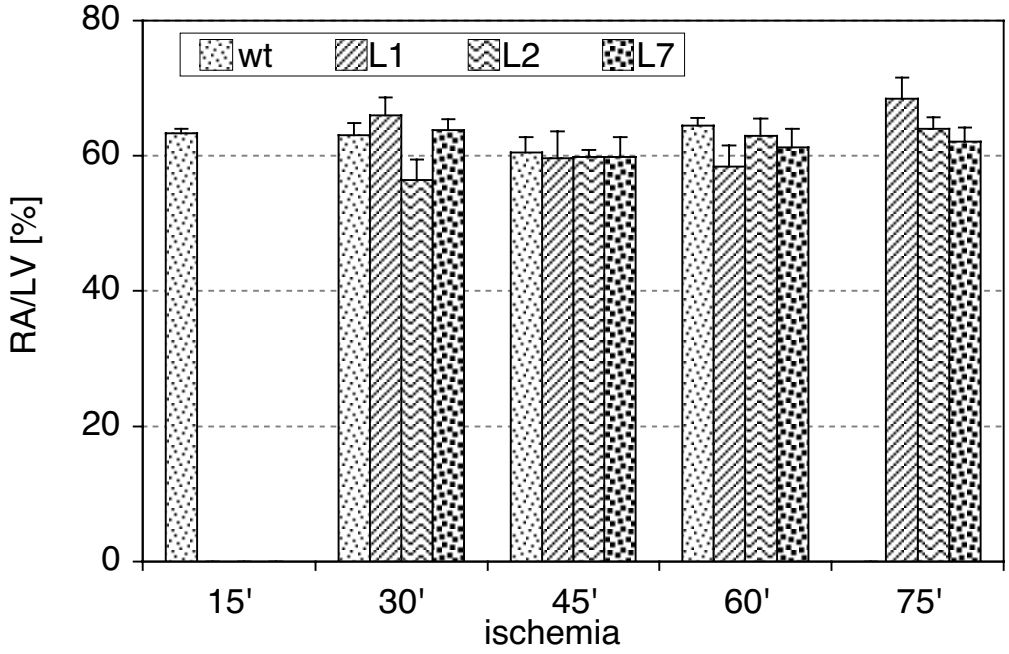

Abb. 10: Risikogebiet (RA) versus linker Ventrikel (LV) in Wildtyp und transgenen Mäusen (L 1, L2, L7). Die Daten sind repräsentiert in %.

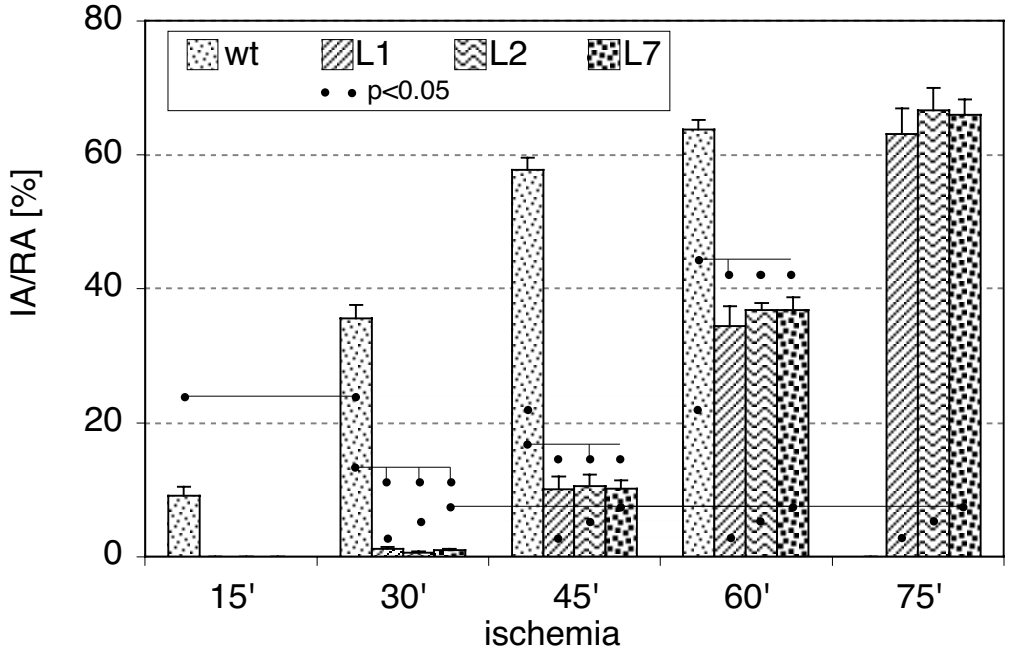

Abb. 11: Infarktgebiet (IA) versus Risikogebiet (RA) in Wildtyp und transgenen Mäusen (L 1, L2, L7). Die Daten sind repräsentiert in %.

In den Kontrolltieren waren die Infarkte bereits nach 15 Minuten sichtbar (IA/RA 9,1 ± 1,4; n=5), während die transgenen Tiere ähnliche Werte erst nach 45 Minuten Ischämie aufwiesen (10,1 ± 1,9; 10,6 ± 1,7 und 10,2 ± 1,2 für L1 (n=5), L2 (n=3) und L7 (n=5)). In Kontrolltieren wurde das maximale IA/RA Verhältnis bereits nach 45 Minuten Ischämie erreicht (57,8 ± 1,8; n=5), während transgene Tiere vergleichbare Werte erst nach 75 Minuten zeigten (63,1 ± 3,8 (n=5); 66,7 ± 3,3 (n=3) und 66,0 ± 2,3 (n=5)). Trotz der zeitlichen Verschiebung von 30 Minuten in der Infarktentwicklung waren die maximalen Infarktgrößen der transgenen Mäuse vergleichbar mit denen der Kontrolltiere (Abb. 11). Nach 60-minütiger Ischämie war in den Wildtyp-Mäusen kein weiterer Anstieg in dem IA/RA Verhältnis festzustellen (63,7 ± 1,5; n=4).

Diese Daten zeigen deutlich, daß auch mit Hilfe des Transgens kein permanenter, sondern nur ein vorübergehender, zeitlicher Schutz vor Nekrose besteht.

1.1.1. Beteiligung der MAPKinasen

Nachdem wir nachweisen konnten, daß ein zeitlich begrenzter Schutz vor Infarzierung in den transgenen Herzen bestand, untersuchten wir mit Hilfe der Western-Blot Analyse die Beteiligung der MAPKinasen an diesem Mechanismus. Hierzu hatten wir myokardiale Biopsien von transgenen (L1 und L7) und Wildtyp-Mäusen (WT) sowohl nach 10 minütiger Ischämie (Isch) als auch, als Kontrolle, ohne Okklusion der Koronararterie entnommen. Zur besseren Verdeutlichung wurden die Werte für die Wildtyp-Mäuse ohne Ischämie auf 100% gesetzt.

Die Western-Blot Analysen zeigten sowohl in den transgenen als auch in den Wildtyp-Tieren eine erhöhte Menge von P-ERK-1 und P-ERK-2 nach einer 10 minütigen Ischämie im Vergleich zum Kontrollgewebe ohne Ischämie. Zusätzlich waren die Werte der transgenen L1 und L7 Tiere sowohl ohne als auch mit Ischämie höher als die der jeweiligen Wildtyp-Tiere (Abb. 12).

Dies bedeutet, daß in den transgenen Tieren beider Linien die aktivierten Formen von ERK-1 und -2 konstitutiv erhöht sind.

Die nicht-phosphorylierten Formen von ERK-1 und -2 hingegen zeigten keine Unterschiede in den Proteinmengen zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren. Dies war unabhängig davon, ob die Proben von Herzen mit oder ohne Ischämie stammten (Abb. 12).

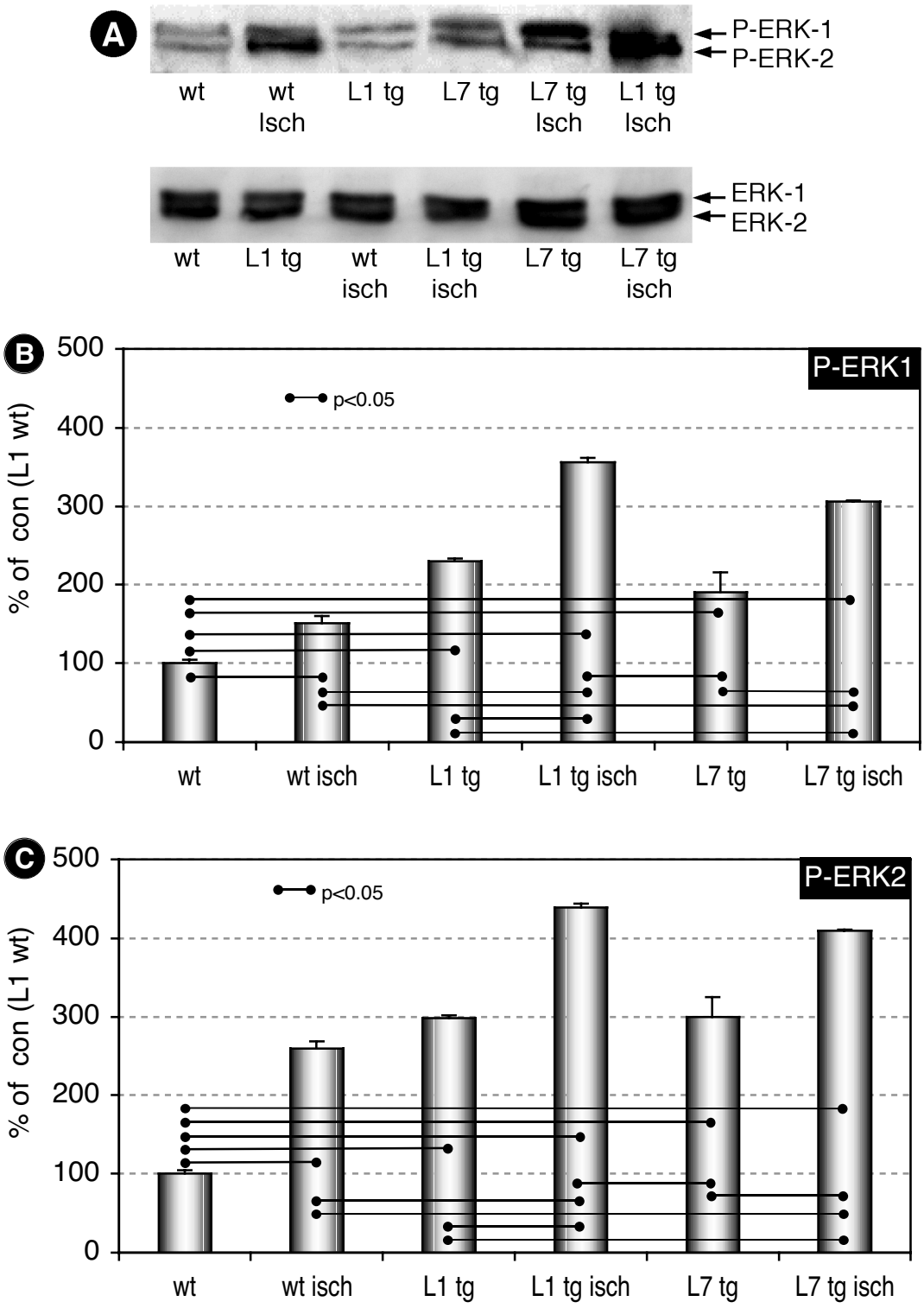

Abb. 12: P-ERK-1 und -2 nach 10 minütiger Ischämie (Isch). Zur besseren Verdeutlichung wurden die Werte für die Wildtyp-Mäuse ohne Ischämie auf 100% gesetzt. ***A*** *Repräsentativer Westernblot;* ***B,C*** *Grafiken für P-ERK-1 und P-ERK-2.*

1.1.2. Hemmung von P-ERK-1 und P-ERK-2

Nachdem wir also wußten, daß P-ERK-1 und P-ERK-2 an der Kardioprotektion beteiligt waren, wollten wir herausfinden, ob nach Ihrer Hemmung, vor Durchführung der Okklusion, noch immer ein Schutzeffekt in den transgenen Herzen anzutreffen sein würde. Falls dem nicht so wäre, waren wir interessiert herauszufinden, ob eine Hemmung der Aktivierung von ERK-1 und -2 mit dem MEK Inhibitor UO126 eine vollständige Aufhebung oder nur eine Verminderung des Schutzeffektes bedingen würde.

Abbildung 13 gibt die relativen Verhältnisse des Risikogebietes zum linken Ventrikel (RA/LV) nach Gabe von UO126/KH/DMSO bzw. KH/DMSO wider. Zwischen den getesteten Gruppen waren keine Unterschiede in den Verhältnissen RA/LV sichtbar (WT/MI45/UO126: 63,7 ± 10,3; WT/MI45/-: 56,3 ± 3,5; TG/MI45/UO126: 66,0 ± 5,3; TG/MI45/-: 59,7 ± 3,9; n=4 für jede Gruppe).

Bei der Berechnung der Infarktgröße in Relation zum Risikogebiet (IA/RA) (Abb. 14) fiel auf, daß in den Wildtyp-Tieren die Gabe von UO126 keinen Einfluß hatte auf die Infarktgröße (WT/MI45/UO126: 65,6 ± 4,9; WT/MI45/-: 57,8 ± 1,8). Bei den transgenen Tieren hingegen konnten signifikant größere Infarkte bei den mit UO126 behandelten Tieren im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen festgestellt werden (TG/MI45/UO126: 25,2 ± 4,4 vs. TG/MI45/-: 10,1 ± 1,9; $p<0,05$). Durch die Gabe des Inhibitors konnte jedoch keine vollständige Aufhebung der Protektion erreicht werden (TG/MI45/-: 10,1 ± 1,9 und TG/MI45/UO126: 25,2 ± 4,4 vs. WT/MI45/-: 57,8 ± 1,8 und WT/MI45/UO126: 65,6 ± 4,9 stets $p<0,05$; n=4 für jede Gruppe).

Um sicher zu gehen, nahmen wir auch von Tieren, die entweder UO126 oder das Lösungsmittel Krebs-Henseleit-Puffer/DMSO (KD) injiziert bekommen hatten Biopsien nach 10 minütiger Ischämie. Auch hier zeigten sich deutlich die Auswirkungen des Inhibitors UO126 (Abb. 15). Während, wie erwartet, die Menge an unphosphoryliertem ERK-1 und -2 nicht variierte, wiesen die transgenen Tiere, die UO126 erhalten hatten, bedeutend geringere P-ERK-1, bzw. P-ERK-2 Mengen auf als die mit KD behandelten Mäuse. Dies galt sowohl für die Gruppe, die einer 10 minütigen Ischämie ausgesetzt worden war, als auch für die Gruppe ohne Ischämie.

Bei den Wildtyp-Tieren waren bei den Gruppen ohne Ischämie keine Unterschiede zwischen UO126 und alleiniger KD-Gabe nachzuweisen. Im Gegensatz hierzu konnte beim Vergleich der Wildtyp-Gruppen, die einer 10-minütigen Ischämie ausgesetzt worden waren, ebenfalls nach Injektion von UO126 deutlich geringere P-ERK-1 und P-ERK-2 Mengen nachgewiesen werden.

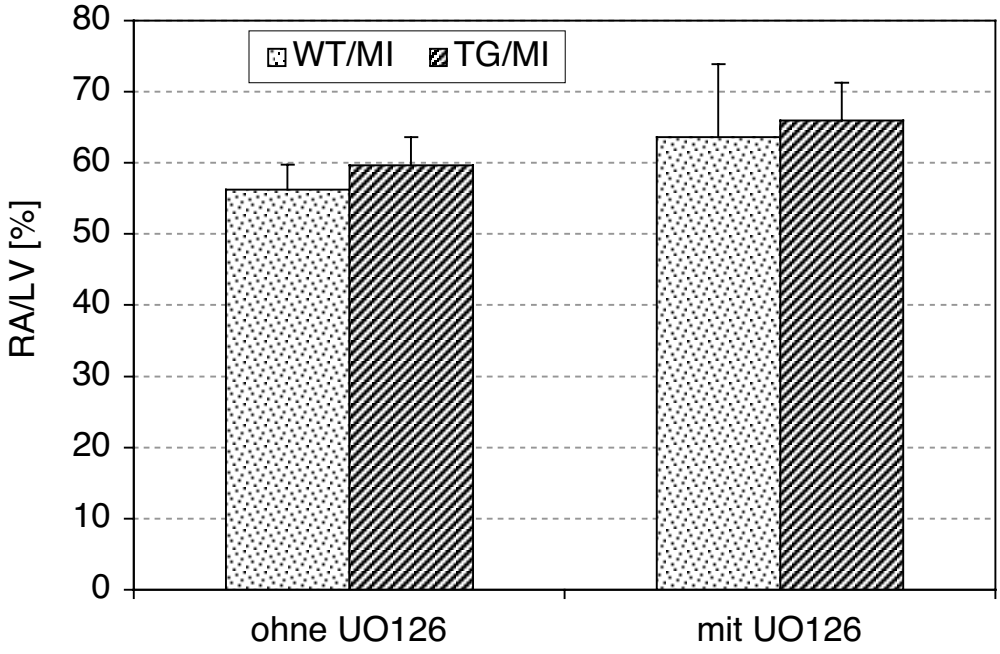

Abb. 13: Risikogebiet (RA) versus linker Ventrikel (LV) in Wildtyp und transgenen Mäusen (L 1) nach UO126 Behandlung. Die Daten sind repräsentiert in %.

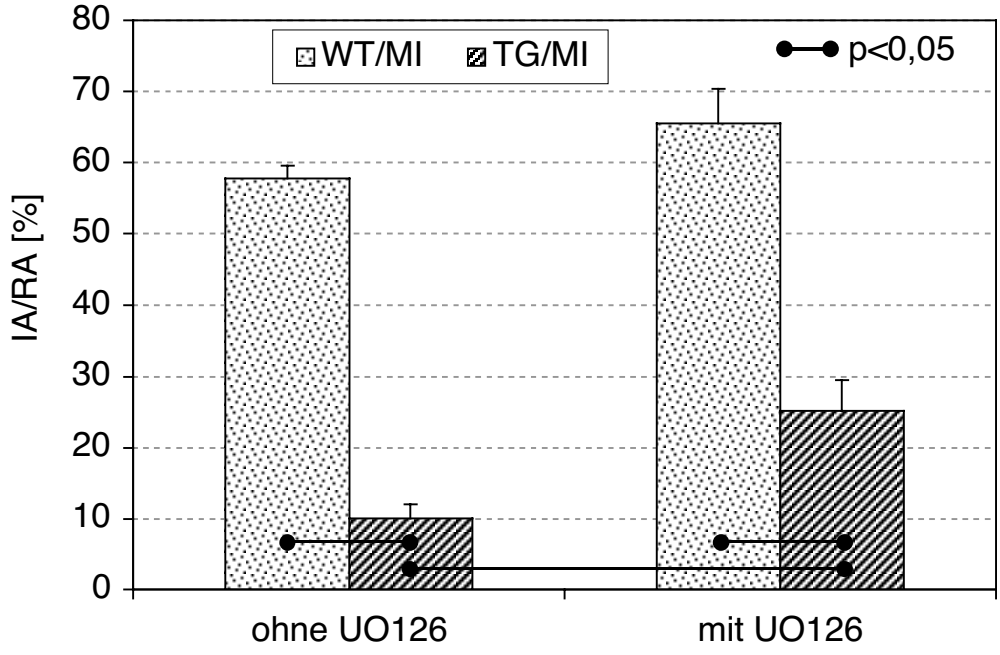

Abb. 14: Infarktgebiet (IA) versus Risikogebiet (RA) in Wildtyp und transgenen Mäusen (L 1) nach UO126 Behandlung. Die Daten sind repräsentiert in %.

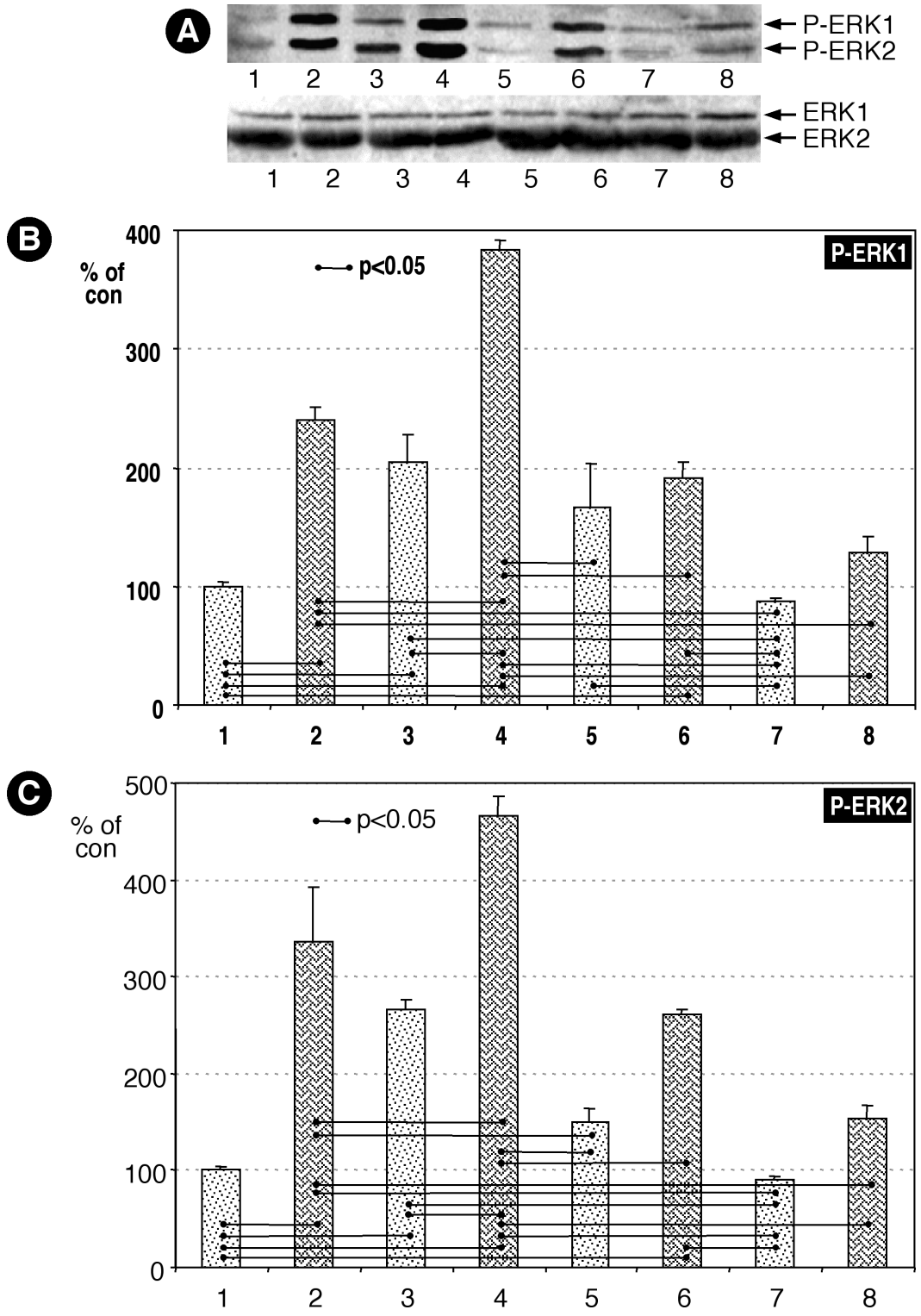

Abb. 15: P-ERK-1 und -2 nach UO126 (UO), bzw. KHB/DMSO (KD) Behandlung und 10 minütiger Ischämie (Isch) von transgenen Tieren der Linie 1 (TG). Der Wert für die Wildtyp-Tiere mit KD-Behandlung und ohne Ischämie (LV/WT/KD) wurde jeweils auf 100% gesetzt.

***A** Repräsentativer Western Blot. **B, C** Grafiken für P-ERK-1 und P-ERK-2*

***1** = LV/WT/KD; **2** = LV/TG/KD; **3** = RA/WT/KD/Isch; **4** = RA/TG/KD/Isch*
***5** = RA/WT/UO/Isch; **6** = RA/TG/UO/Isch; **7** = LV/WT/UO; **8** = LV/TG/UO*

1.2. Blutdruck und Herzfrequenz (Abb. 16)

Da aus anderen Studien bekannt war, daß FGF-1 Einfluß hat auf die Blutdruckregulierung, war dieser in transgenen und Wildtyp-Tieren der Linie 1, 2 und 7 im Verlauf von 30 Minuten Ischämie gemessen worden.

Der mittlere Blutdruck (MABP) der Wildtyp-Tieren (WT) war zu den meisten Zeitpunkten mit dem der transgenen Tieren der Linie 7 (L7) vergleichbar. Ebenfalls waren keine Unterschied im MABP zwischen der Linie 1 (L1) und der Linie 2 (L2) nachweisbar. Am Auffallendsten war die Tatsache, daß der MABP der Linie 7 zu den meisten der gemessenen Zeitpunkte signifikant höher war als der MABP der Linie 1 und 2.

Innerhalb der einzelnen Linien waren signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten „baseline“ und „vor koronärer Okklusion (vKO)“ bzw. koronärer Okklusion (KO) vorhanden. Im weiteren Verlauf der Aufzeichnung (KO bis 30 Minuten nach KO) blieb der MABP innerhalb jeder Linie konstant.

Die Auswertung der Herzfrequenz wies bis auf je zwei Zeitpunkte keine Unterschiede zwischen bzw. innerhalb der verschiedenen Genotypen auf. Bei den signifikanten Werten ($p<0,05$) handelt es sich um:

WT (vKO) vs. L2 (vKO)
WT (10' KO) vs. L2 (10' KO)
L1: 10' vs. vKO
L1: 15' vs. vKO

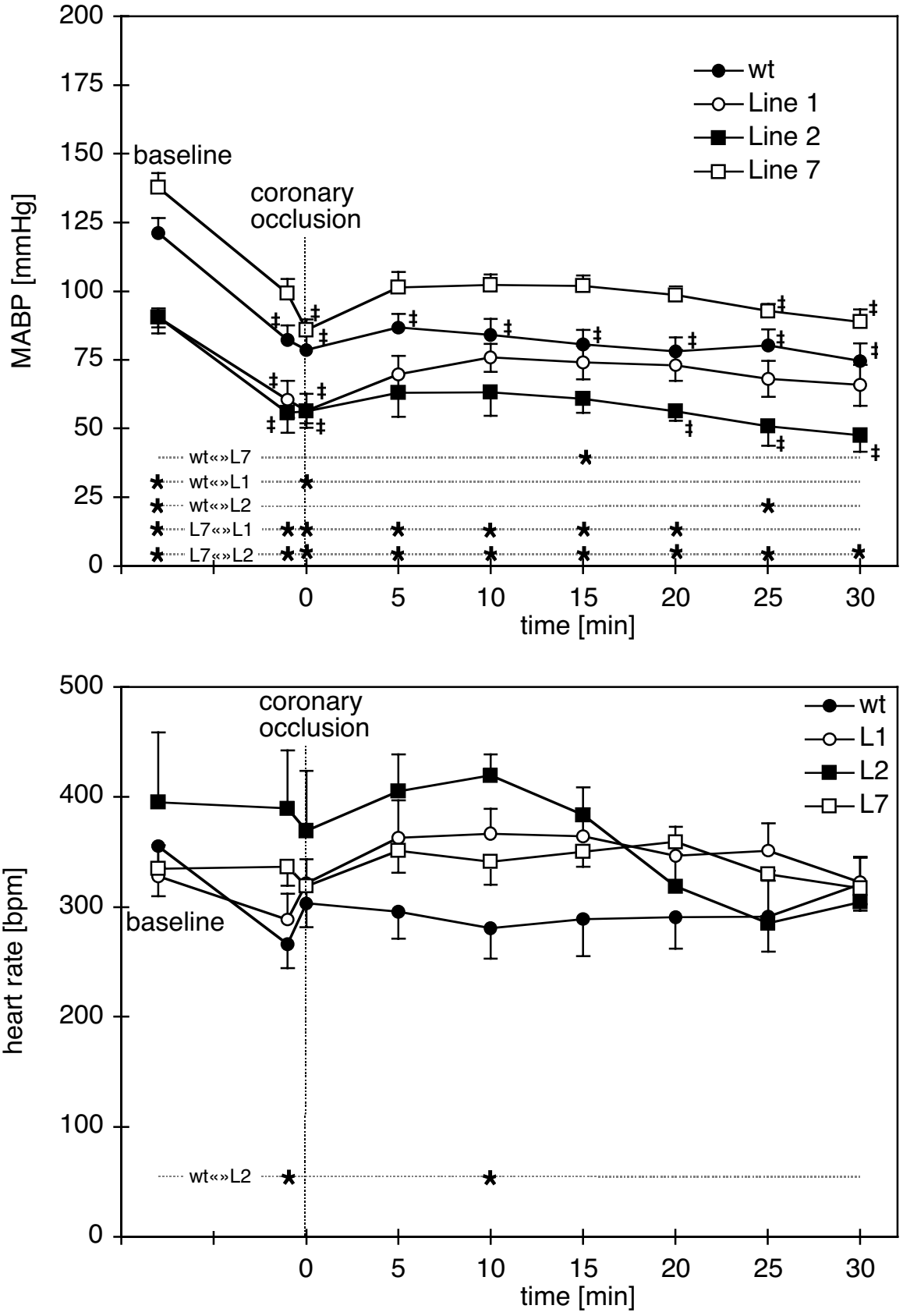

Abb. 16: zeigt den mittleren Blutruck (MABP) und die Herzfrequenz für alle Gruppen vom Beginn der Operation (baseline) bis 30 Minuten nach der Okklusion.

‡ p<0,05 vs. baseline

2. Langzeitischämie

Sowohl die Sham operierten als auch die infarzierten Mäuse erholten sich nach Erwachen aus der Narkose relativ schnell und begannen innerhalb weniger Minuten mit der Futter- und Wasseraufnahme. Die Todesrate betrug direkt nach der Operation - in der Aufwachphase - ca. 30%. Fast alle dieser Tiere gehörten der Infarktgruppe an. Nach den ersten kritischen 24 Stunden post operationem gab es keine Todesfälle mehr zu verzeichnen. Im weiteren postoperativen Verlauf war das Allgemeinbefinden der Tiere ungestört.

Bei der Herzentnahme nach einer Woche konnten makroskopisch keine pathologischen Veränderungen des Organs festgestellt werden. Körpergewicht (BW: body weight), Herzgewicht (HW: heart weight), und die HW/BW-Verhältnisse waren in beiden Genotypen vergleichbar. Ebenso wurden keine Unterschiede zwischen den infarzierten und den Sham Tieren festgestellt.

2.1. Hämodynamik

Der Volumenüberschuß, der von der zügigen Infusion von 2,5 ml Kochsalzlösung herrührte, resultierte in einem Anstieg des Cardiac Index (CI; Abb. 17) und des mittleren peripheren Blutdrucks (MABP; Abb. 18). Zusätzlich war ein verminderter totaler peripherer Widerstand (TPR; Abb. 19) und eine verminderte Herzfrequenz (HR; Abb. 20) nachweisbar.

Die Ausgangswerte der Herzfunktionen, die nach der Ruhephase gemessen worden waren, waren in SHAM operierten transgenen Tieren niedriger als bei den Wildtyp-Tieren. Der Cardiac Index (CI) der FGF/SHAM Gruppe betrug 0,16 ± 0,06 im Gegensatz zu 0,21 ± 0,01 in der WT/SHAM Gruppe ($p<0,05$).

Nach Volumenbelastung war der maximale Cardiac Index in beiden Genotyp-Gruppen vergleichbar (FGF/SHAM 0,47 ± 0,09; WT/SHAM 0,51 ± 0,11).

Die Aufzeichnung der Grundwerte zeigte in beiden Infarkt-Gruppen vor und nach Volumenbelastung eine statistisch signifikante Verschlechterung ($p<0,05$) der Herzfunktionen.

Außerdem war während den Grundwert-Aufzeichnungen in der FGF/MI-Gruppe der Cardiac Index signifikant niedriger im Vergleich zu den Cardiac Index-Werten in nicht-transgenen Wurfgeschwistern (FGF/MI 0,12 ± 0,06 vs. WT/MI 0,17 ± 0,05; $p<0,05$) und nach Volumenbelastung (FGF/MI 0,27 ± 0,08 vs. WT/MI 0,38 ± 0,05; $p<0,05$).

Es wurden keine Änderungen in der Herzfrequenz (WT/MI 509 ± 25 vs. FGF/MI 517 ± 24) und des totalen peripheren Widerstands (WT/MI 5,6 ± 0,8 vs. FGF/MI 5,6 ± 1,1) gefunden, die den verminderten Cardiac Index in den FGF/MI Tieren erklären könnten.

Diese Daten weisen auf eine wesentliche Verschlechterung der Herzkontraktilität hin, deren Ursache in einem verminderten Schlagvolumen zu liegen scheint.

Eine Auswirkungen des Geschlechts auf die Resultate kann ausgeschlossen werden, da nach Korrektur des Körpergewichts keine Unterschiede festgestellt werden konnten.

2.2. Histologie

2.2.1. Infarktgrößen (Tab. 5)

Beide Infarktgruppen (transgene und Wildtyp-Gruppe) wiesen ähnliche Infarktgrößen in Relation zum linken Ventrikel (IA/LV) auf. Bei den Wildtyp-Tieren waren dies 38,0 ± 2,8% gegenüber 40,2 ± 2,7 in der transgenen Infarkt Gruppe. Beide Sham Gruppen zeigten keine Anzeichen eines Infarktes.

2.2.2. Kapillarisierung (Tab. 5)

Die kapilläre Dichte des interventrikulären Septum wies keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen auf. Folglich haben weder der Genotyp noch der Myokardinfarkt die kapilläre Dichte in diesem Bereich des Herzens maßgeblich beeinflußt.

In der eigentlich interessanteren Randzone war es aufgrund von zu starkem Hintergrund, bzw. unspezifischer Anfärbung jedoch nicht möglich, eine korrekte Zählung durchzuführen. Dieses Problem stellt sich nicht nur uns, sondern auch den meisten anderen Forschungsgruppen. Wir arbeiten zur Zeit an einer anderen Möglichkeit, die Kapillaren auch im Randgebiet darstellen zu können. Dies liegt jedoch nicht mehr im zeitlichen Rahmen dieser Doktorarbeit.

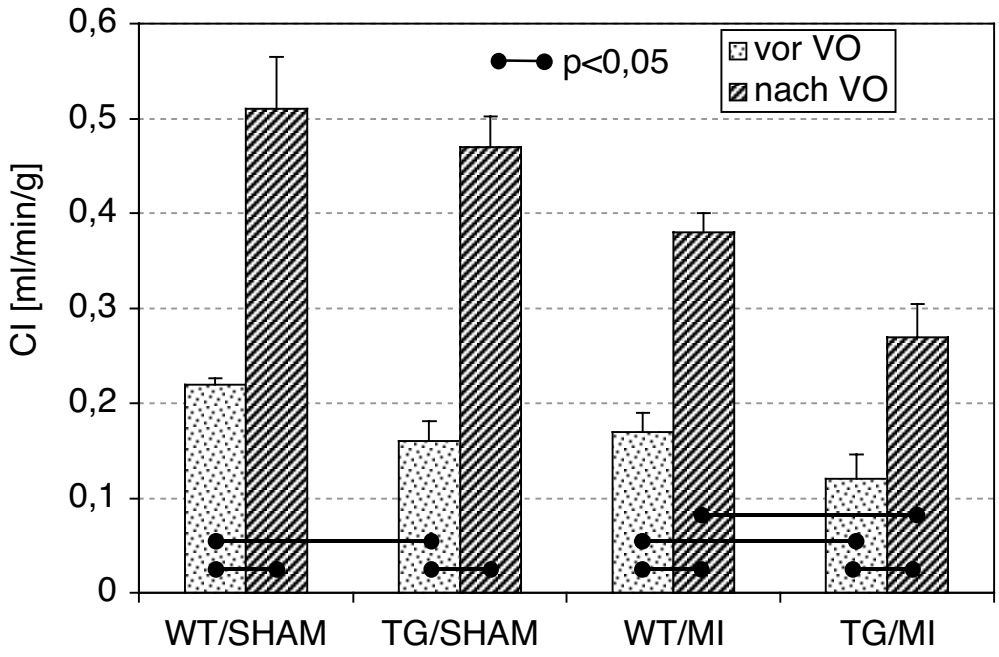

Abb. 17: Cardiac Index (CI) vor und nach Volumenüberschuß (VO)

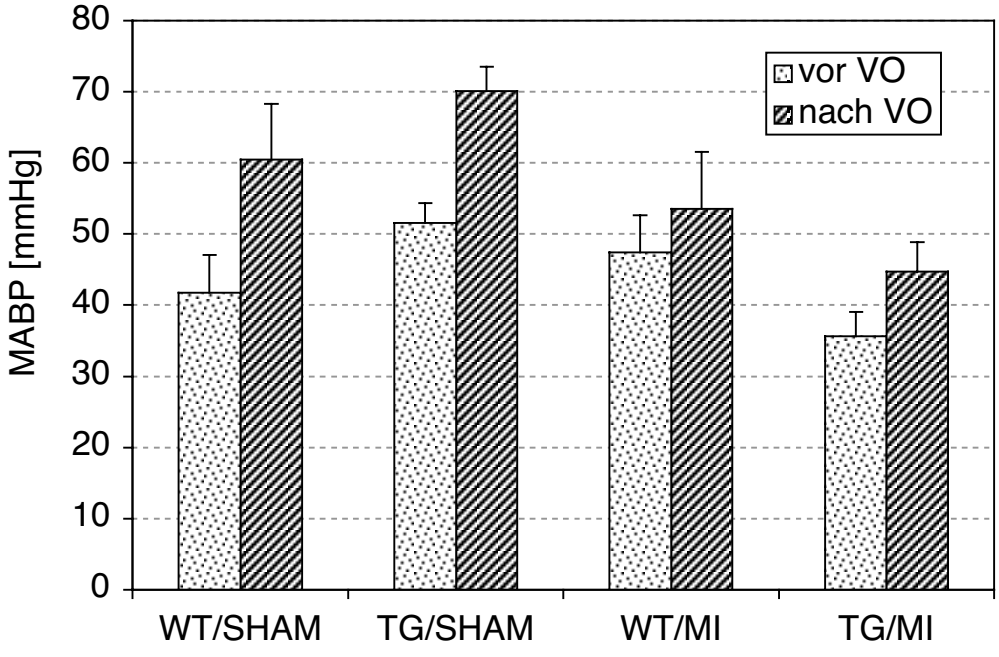

Abb. 18: Mittlerer peripherer Blutdruck (MABP) vor und nach Volumenüberschuß (VO)

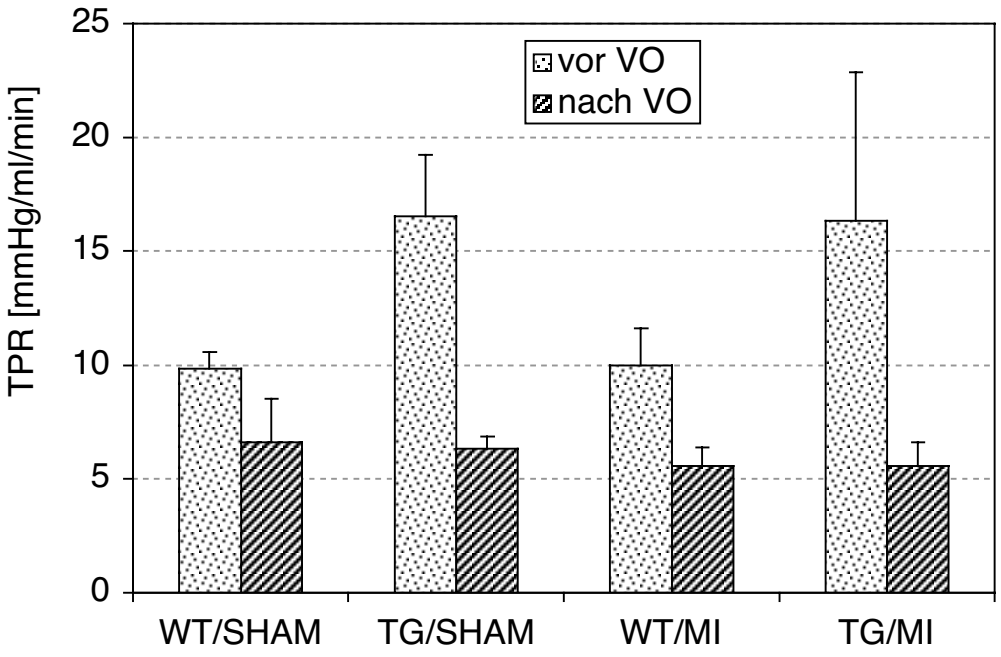

Abb. 19: Totale periphere Resistenz (TPR) vor und nach Volumenüberschuß (VO)

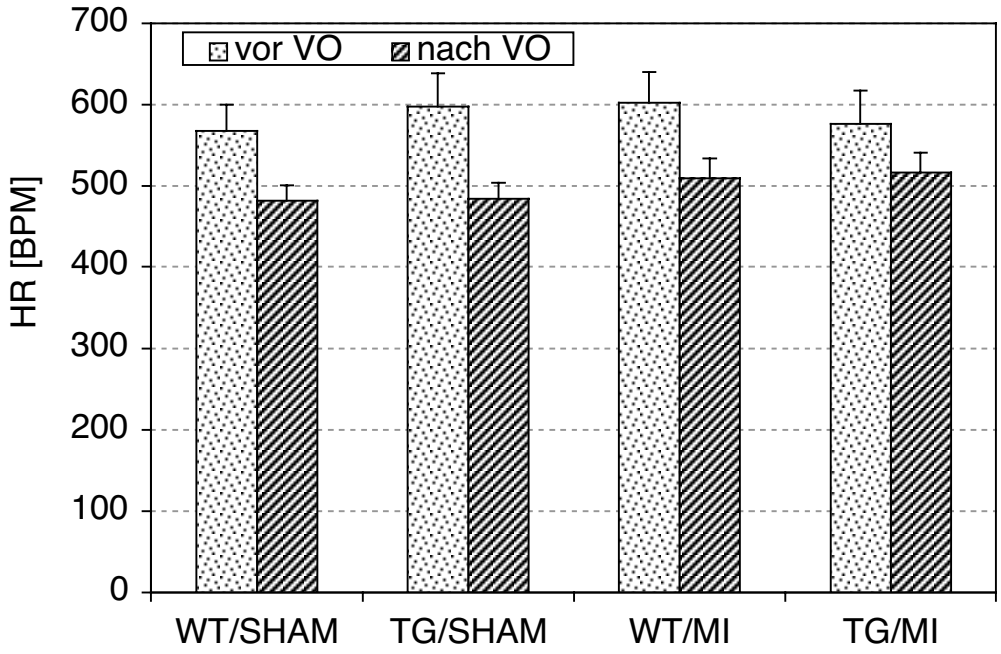

Abb. 20: Herzfrequenz (HR) vor und nach Volumenüberschuß (VO)

2.2.3. Gewebeumbau im interventrikulären Septum (Tab. 5)

Sowohl bei den FGF-1 transgenen als auch bei den Wildtyp-Tieren resultierte die Induktion eines Myokardinfarkts in einem Anstieg der Septumdicke. In den transgenen infarzierten Herzen war die hypertrophische Antwort signifikant stärker ausgeprägt. Das Septum dieser Tiere wuchs von 1,07 ± 0,12 mm auf 1,16 ± 0,08 mm an. Bei den Wildtyp-Tieren war der Zuwachs bedeutend geringer ausgeprägt. Bei ihnen stieg die Septumdicke von 0,85 ± 0,12 mm auf 0,95 ± 0,06 mm. Die hypertrophische Antwort war folglich in den Herzen der FGF-1 transgenen Mäuse stärker ausgeprägt.

Bei der Auswertung der Dilatation nach einem Infarkt wurden zwischen den transgenen und den Wildtyp-Tieren keine Unterschiede gefunden.

2.2.4. Apoptose (Tab. 5)

In dem Granulationsgewebe waren die Werte der Apoptoserate (sowohl TUNEL als auch aktivierte Kaspase 3 positive Zellen) in beiden SHAM-operierten Gruppen sehr niedrig. Nach dem Myokardinfarkt stiegen die Apoptose-Raten von <0,001% auf 0,6 ± 0,1% ($p<0,05$) in Wildtyp-Tieren. In FGF-1 Herzen stieg die Apoptose-Rate von <0,001% auf 1,1 ± 0,1% ($p<0,05$) nach einem Infarkt an. Die Apoptoserate war in dem Granulationsgewebe der FGF-1 transgenen Mäuse signifikant höher als in den Wildtyp-Mäusen (0,6 ± 0,1 % in WT vs. 1,1 ± 0,1% in TG; $p<0,05$).

In dem interventrikulären Septum wurde keine Änderung der Apoptose-Rate nach einem Myokardinfarkt gefunden. Zusätzlich konnte eine Apoptose von Kardiomyozyten zu diesem Zeitpunkt nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 5: Histologische Resultate der Langzeitischämie

	WT/SHAM	**WT/MI**	**FGF/SHAM**	**FGF/MI**
IA/LV [%]	0	38,0 ± 2,8	0	40,2 ± 2,7
CD [/mm^2]	10982 ± 1010	9360 ± 871	9524 ± 641	7605 ± 862
ST [mm]	0.85 ± 0.12	0.95 ± 0.06	1.07 ± 0.12	1.16 ± 0.08 #
LVFWTh [mm]	0.95 ± 0.06	0.50 ± 0.05∗	1.03 ± 0.12	0.55 ± 0.03ψ
Apoptose [%]	<0,001	0,6 ± 0,1	<0,001	1,1 ± 0,1 #

Infarktgröße in Relation zum linken Ventrikel (IA/LV) in %; Kapillarisierungsdichte (CD) per mm^2 ; Septumdicke (ST) in mm; Dicke der linksventrikulären freien Wand (LVFWTh)
#: $p<0,05$ für FGF/MI vs. WT/MI; ∗: $p<0,05$ für WT/SHAM vs. WT/MI;
ψ: $p<0,05$ für FGF/SHAM vs. FGF/MI

VI. DISKUSSION

Für die vorliegende Doktorarbeit wurde zum ersten Mal eine Studie bezüglich der kardioprotektiven Rolle von FGF-1 an Tieren durchgeführt, die konstitutiv eine kardiale Überexpression von FGF-1 besitzen. Somit präsentiert die Studie erstmalig die Auswirkungen einer permanenten kardialen Überexpression von FGF-1 auf die Infarktentwicklung und damit zusammenhängend auf die kardialen Umbauprozesse und die Herzfunktionen nach einem akuten Myokardinfarkt.

Mit unseren Experimenten zeigen wir, daß aufgrund der Überexpression von FGF-1 die Infarktentwicklung deutlich verzögert auftritt, letztendlich jedoch die Größe des Infarktgebietes gleiche Ausmaße wie bei den Wildtyp-Tieren erreicht.

Nach Injektion des Inhibitors UO126 war keine Protektion mehr nachweisbar. Dies deutet darauf hin, daß die MAPKinasen ERK-1 und -2 an der Protektion maßgeblich beteiligt sind.

Desweiteren resultierte eine konstitutive herzspezifische Überexpremierung von FGF-1 in Mäusen in einer Verschlechterung der Herzfunktionen und Veränderungen in dem linksventrikulären Umbauprozeß nach einem einwöchigen akuten myokardialen Infarkt.

Die bisherigen Untersuchungen sprechen gegen einen angiogenen/arteriogenen Effekt von endogenem FGF-1 nach einem Myokardinfarkt. Daher muß davon ausgegangen werden, daß es sich bei der vermehrten Anzahl von vor allem kleinen Arteriolen, die in den Herzen der transgenen Mäuse zu finden sind, nicht um funktionelle Kollateralen handelt. Dies unterstützt unsere These nach einem trophischen Mechanismus wie es die Arbeitsgruppe von Herrn Schaper schon seit längerer Zeit postuliert.

1. Genlokalisationseffekt

Für die vorliegende Arbeit wurden transgene Mäuse entwickelt, die das humane FGF-1 herzspezifisch überexprimieren [136]. Es ist bewiesen, daß neben den Auswirkungen durch das "neue" Gen, bereits das Einbauen von Genen den Phänotyp verändern kann. Hierbei spielt der Genlokus auf dem das Transgen sitzt eine wichtige Rolle. Es ist durchaus möglich, daß durch das Einbauen an einer "ungeeigneten" Stelle ein anderes Gen an- oder ausgeschaltet werden kann. Dies wird auch als Genlokalisationseffekt bezeichnet [42,148,149]. Nachweisbare Veränderungen im Phänotyp haben also nicht zwangsläufig ihre Ursache in dem Gen selbst.

Mit den bisherigen Techniken ist es oft nicht möglich, um vor Einschleusung des Transgens genau festzulegen wo und wie oft (mit wieviel Kopien) das neue Gen in das Genom eingebaut wird. Im Gegensatz dazu ist es jedoch auch möglich, daß das Gen an einer Stelle eingebaut wird, wo das neue Gen nicht oder nur unter bestimmten Voraussetzungen abgelesen wird. Um auszuschließen, daß dies die Ursache für die erzielten Studienresultate ist, müssen die Versuche stets an mindestens zwei Linien durchgeführt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit drei verschiedenen transgenen Mäuselinien gearbeitet. Die Linie 1 und 2 tragen das gleiche Konstrukt (CMV/MLC2v/hFGF-1/SV40), während bei dem Konstrukt der Linie 7 der CMV-Verstärker weggelassen wurde (MLC2v/hFGF-1/SV40) [136]. Wir haben uns dennoch entschieden zumindest in einigen Untersuchungen auch diese Linie einzubeziehen.

Alle transgenen Tiere sind lebensfähig und machen einen gesunden Eindruck. Bezüglich Körpergewicht, Herzgewicht und Zuchterfolgen sind sie nicht von ihren nicht-transgenen Wurfgeschwistern zu unterscheiden. Die bisher ältesten FGF-1 transgenen Mäuse erreichten ein Alter von über 2 Jahren. Somit ist auch die Lebenserwartung vergleichbar mit denen der Wildtyp-Tiere. Dies alles deutet darauf hin, daß das Transgen in keiner der drei untersuchten Linien schwerwiegende Veränderung erzeugt. Genaueres über die Charakterisierung der transgenen Mäuse ist im Anhang nachzulesen.

Alle drei untersuchten Linien zeigten gleiche Werte bezüglich der Infarktentwicklung. Bei den hämodynamischen Werte hingegen, waren Unterschiede zwischen den beiden transgenen Konstrukten sichtbar. Während des gesamten Kurzzeitischämieversuches wiesen die Linien 1 und 2 einen niedrigeren Blutdruck auf als die Wildtyp-Mäuse. Im Gegensatz hierzu war der Blutdruck der Linie 7 Tiere höher als in den Wildtyp-Mäusen. Die Daten waren jedoch nicht für alle Zeitpunkte signifikant. Die Herzfrequenz war bis auf zwei Ausnahmen zu allen ausgewerteten Zeiten vergleichbar zwischen allen Mäusegruppen.

Aufgrund der Tatsache, daß die Herzfrequenz und die Infarktentwicklung in den Tieren der Linie 7 nicht von denen der Linie 1 und 2 abweicht, ist der Genlokalisationseffekt bezüglich der kardioprotektiven Wirkung unwahrscheinlich. Man kann davon ausgehen, daß diese an das transgene FGF-1 gekoppelt ist.

2. Verzögerte Infarktentwicklung (Nekrose), aber gleicher Endeffekt

Durch die Überexpression von FGF-1 kommt es in den transgenen Tieren zu einem verzögerten Beginn der Infarktausbildung nach einem akuten Myokardinfarkt. Sobald der Prozess der Infarzierung jedoch einmal begonnen hat, laufen die weiteren Schritte mit der gleichen Geschwindigkeit ab wie in den Wildtyp-Tieren. Die Größe des Risikogebietes und die letztendlichen Infarktgrößen waren in allen drei transgenen Linien und den Wildtyp-Tieren gleich groß.

Die Resultate der vorliegenden Studie sind vergleichbar mit denen früherer aus unserem Hause mit exogenem FGF-1. Hierbei konnten wir bereits zeigen, daß exogenes FGF-1 eine direkte kardioprotektive Wirkung hat [10]. Außerdem verlängert es das Überleben von Zellen bei Ischämie/Reperfusions-bedingtem Schaden am Herzen [13,150]. Hieraus kann geschlußfolgert werden, daß eine Überexpression von FGF-1 im Herzen nur einen bedingten, kurzzeitigen positiven Effekt auf das Zugrundegehen des Herzgewebes (Nekrose) hat. Man kann daher von einem trophischen Effekt von endogenem FGF-1 ausgehen.

Aufgrund der Tatsache, daß die transgenen Tiere ein dichteres arterioläres Netzwerk besitzen, und bei experimenteller maximaler Dilatation mehr Koronarfluß vorhanden ist [136], hätte man erwarten können, daß die transgenen Tiere sowohl ein kleineres Risikogebiet als auch ein kleineres Infarktgebiet aufweisen würden als die Wildtyp-Tiere. Dies hat sich jedoch nicht bestätigt. Die Größe des Risikogebietes im Verhältnis zum linken Ventrikel ist bei allen drei transgenen Linien und den Wildtyp-Tieren vergleichbar. Das läßt den Rückschluß zu, daß trotz der vermehrten Anzahl von Arteriolen nicht mehr funktionelle Kollateralgefäße in den Herzen der transgenen Mäuse ausgebildet worden sind.

Bisher ist es bei der Maus aus technischen Gründen leider (noch) nicht möglich den kollateralen Blutfluß zu bestimmen. Unsere Schlußfolgerung, daß keine vermehrte kollaterale Perfusion stattgefunden hat, stützt sich daher auch auf die Tatsache, daß ein lineares Verhältnis zwischen der maximalen Infarktgröße und dem Kollateralfluß besteht [151]. Die erhöhte Anzahl der Arteriolen läßt sich dadurch erklären, daß die transgenen Tiere mehr arterielle Abzweigungen der beiden Haupt-Koronararterien aufweisen. Es handelt sich hierbei folglich um parallele Gefäße, deren Ursprung distal der Okklusionsstelle liegt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß in unserem Modell FGF-1 keinen Einfluß auf die Angiogenese, wohl aber auf die Arteriogenese und die genetisch determierte

Gefäßaufzweigung hat. Demzufolge ist der kardioprotektive Effekt von endogenem FGF-1 auf trophische Faktoren zurückzuführen.

3. Diskussion der *in vivo* Propidium Iodid-Färbung im Vergleich zur *ex vivo* Triphenyltetrazolium Chlorid-Färbung

In unserem Kurzzeitischämie-Modell haben wir die Infarktgröße mit Propidium Iodid sichtbar gemacht. Hierbei handelt es sich um eine *in vivo* Färbung mit deren Hilfe die Zellkerne von Zellen mit beschädigter Membran angefärbt werden. Nach der bisherigen Auffassung, daß bei der Nekrose, aber nicht bei der frühen Apoptose, die Zellmembran zerstört wird [152], kann man davon ausgehen, daß nur die Kerne der durch die Ischämie nekrotisch gewordenen Zellen durch Propidium Iodid angefärbt werden [46]. Bei intakter Membran ist es für Propidium Iodid unmöglich in die Zelle einzudringen. Propidium Iodid bindet irreversibel an den Zellkern. Dies geschieht durch Interkalation mit der DNS. Hierdurch wird eine leuchtend rote Fluoreszenz produziert [153,154], die mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes sichtbar gemacht wird.

Erste Auswirkungen einer kardialen Apoptose sind außerdem frühestens eine Stunde nach erfolgtem Infarkt zu erwarten. Dies wurde in einer Studie an Ratten gezeigt, wobei nach einem Infarkt die ersten apoptotischen Zellen nach 1-2 Stunden vorhanden waren [155,156].

Dies bedeutet, daß die in unseren Kurzzeitischämie-Versuchen vorhandenen Infarkte aus nekrotischen Zellen bestehen.

Zu Beginn des Projekts standen zwei verschiedene Protokolle bezüglich der Sichtbarmachung des infarzierten Gewebes zur Auswahl. Beide Modelle sind in der Literatur ausführlich beschrieben und allgemein anerkannt [46,47]. Einerseits handelte es sich hierbei um die sogenannte Triphenyltetrazolium Chlorid-Färbung, kurz "TTC-Färbung", und andererseits um die Anfärbung unter Zuhilfenahme von Propidium Iodid.

In einer früheren Publikation aus unserem Hause sind beide Methoden bereits miteinander verglichen worden [46]. Für uns ausschlaggebend war die Tatsache, daß für die TTC-Färbung die Reperfusionsphase für das Mäuseherz minimal drei Stunden lang andauern muß, um genaue Aussagen bezüglich der Infarktgröße machen zu können [45]. Da wir die Infarktentwicklung über einen Zeitraum von 15-75 minütiger Okklusion studieren wollten, erschien uns diese Methode als nicht geeignet. Außerdem ist nach dieser langen Reperfusionsdauer zusätzlich zu den Ischämieschäden auch mit Reperfusionsschäden zu rechnen. Nach der von uns

benutzten Reperfusionsphase von 20 Minuten sind bedeutend geringere Auswirkungen auf die Infarktgröße zu erwarten.

Im Gegensatz zu der TTC-Färbung benötigt die Bindung von Propidium Iodid an den Zellkern nur wenige Minuten. In einzelnen Versuchen mit 10 minütiger Reperfusion zeigte sich, daß selbst diese Zeit für eine Anfärbung des infarzierten Gewebes ausreichend ist (eigene Beobachtung).

Aufgrund dessen, daß nur der Zellkern und kein Gebiet angefärbt wird, ist die Auswertung schwieriger. Es ist daher möglich, daß die von uns ermittelten Angaben über die prozentuale Infarzierung innerhalb des Risikogebietes nicht hundertprozentig mit der tatsächlichen Größe des Infarktes übereinstimmen, aber schließlich ging es uns nicht darum, absolute Zahlen zu ermitteln, sondern Vergleiche anzustellen zwischen der Infarktentwicklung in den transgenen Tieren und der der Wildtyp-Tieren. Zusätzlich wurde die gesamte Auswertung von einer Person durchgeführt um eine ähnliche Auswertung aller Herzscheiben zu gewährleisten.

4. Auswirkung einer kardialen FGF-1 Überexpression auf die Apoptose

Außer auf die Nekrose übt FGF-1 auch einen Einfluß auf die Apoptose von Zellen aus. Während Cuevas et al. in ihren Versuchen zeigten, daß exogenes FGF-1 die myokardiale Apoptoserate vermindert [157], zeigen unsere Versuche, daß die Überexpremierung von FGF-1 während der Umbauphase nach einem Myokardinfarkt in einer höheren Apoptose-Rate in dem Narben, bzw. Wund-Gewebe nach einem einwöchigen Myokardinfarkt resultiert.

Seit einigen Jahren ist bekannt, daß nach einem Myokardinfarkt die Zellen nicht nur durch Nekrose, sondern auch durch Apoptose zugrunde gehen. Im Gegensatz zur Nekrose bleiben bei der Apoptose die Zellen zunächst intakt. Die Zellgröße bleibt entweder unverändert oder wird geringer. Bereits nach einigen Tagen jedoch beginnt auch die Zellmembran der apoptotischen Zellen ihre Integrität zu verlieren. Ab diesem Zeitpunkt sind diese Zellen nicht mehr von nekrotischen Zellen zu unterscheiden [152,156].

Eine mögliche Erklärung für die höhere Apoptoserate in den transgenen Herzen könnte die Tatsache sein, daß der Wundheilungsprozess in den FGF-1 transgenen Herzen verzögert abläuft und folglich das Apoptose-Maximum später auftritt. Die Resultate unserer Kurzzeitstudie lassen darauf schließen, daß das endogene FGF-1 nicht nur die Nekrose, sondern auch die Apoptose eher verzögert als verhindert.

Um die Frage, ob endogenes FGF-1 vor Apoptose schützt oder diese nur verzögert, besser beantworten zu können, bedarf es weitergehenden Studien. Augenblicklich werden in Maastricht Experimente durchgeführt, um die Frage nach dem zeitlichen Auftreten von Apoptose in den FGF-1 transgenen und den Wildtyp-Mäusen zu klären.

5. Remodeling nach einwöchiger Infarktdauer

FGF-1 übt nicht nur einen kurzfristigen Effekt auf das kardiovaskuläre System aus, sondern nimmt - wie bereits erwähnt - auch Einfluß auf die Gefäßbildung. Passend zu unseren früheren Resultaten, daß die FGF-1 transgenen Tiere keine vermehrte Angiogenese im Herzen aufweisen [136], war auch nach einem einwöchigen akuten Myokardinfarkt kein vermehrtes Kapillarwachstum (Kapillardichte) in den Herzen der transgenen Tiere im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren feststellbar. Bei beiden Genotypen war die Zunahme der Kapillardichte nach einem Herzinfarkt vergleichbar. Dies bedeutet, daß die experimentelle Ischämie keine stärkere Angiogenese in den transgenen Tieren hervorruft als in den Wildtyp-Tieren. Dies unterstützt unsere Hypothese, daß endogenes FGF-1 im Vergleich zu exogenem FGF-1 eher eine Rolle bei der Arteriogenese als bei der Angiogenese spielt [136].

In Studien anderer Gruppen mit exogenem FGF-1 und/oder FGF-2 wurde bereits gezeigt, daß diese sowohl bei den koronären als auch bei den peripheren Gefäßerkrankungen eine wichtige Rolle spielen [158-161]. Die Formation von neuen Kapillaren benötigt eine komplexe Interaktion zwischen verschiedenen angiogenen Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren. Zusätzlich zu der FGF-Familie sind die VEGF-Proteine und ihre Tyrosin Kinase Rezeptoren für einen adäquaten Umbau des kapillären Netzwerkes als Antwort auf Veränderungen im geweblichen Sauerstoffverbrauch unerläßlich. Die Rolle von exogenem FGF-2 und exogenem FGF-1 in ischämischen Herzerkrankungen ist schon ausführlich untersucht worden. Seit kurzem ist ebenfalls eine Arbeit veröffentlicht, die die Auswirkungen von endogenem FGF-2 beschreibt [162]. Im Gegensatz dazu ist über endogenes FGF-1 und seine Rolle bei sowohl akuten als auch chronischen Herzinfarkten bisher wenig bekannt. Dadurch, daß exogenes FGF-1 und FGF-2 die Angiogenese fördern, induzieren sie die Revaskularisierung im ischämischen Myokard [11,92,93,163-166]. Im Vergleich hierzu hat endogenes FGF-1 einen anderen Effekt als endogenes FGF-2. Während unsere FGF-1 transgenen Mäuse eine unveränderte Kapillardichte aufweisen und zur gleichen Zeit mehr Arteriolen vorhanden sind [136], besitzen die FGF-2 transgenen Mäuse eine erhöhte Kapillardichte bei gleichbleibender Arteriolendichte [162]. Dies deckt sich daher nur im Fall von endogenem FGF-1 mit

der Hypothese, daß Angiogenese durch Hypoxie ausgelöst wird, während Arteriogenese von den Wachstumsfaktoren beeinflußt wird. Man kann also davon ausgehen, daß endogenes FGF-1 und endogenes FGF-2 unterschiedliche Einflüsse auf die Gefäßentwicklung ausüben. Zur Überprüfung dieser Hypothese müssen jedoch noch weitere Studien bezüglich des Signaltransduktionsweges der beiden Wachstumsfaktoren erfolgen. Die Kreuzung der beiden transgenen Mäuse und weitergehende Untersuchungen an ihnen könnten ebenfalls für eine vermehrte Einsicht in die Effekte von FGF-1 und -2 sorgen.

6. Hämodynamik

Abhängig vom transgenen Konstrukt, wiesen die transgenen Tiere während des Kurzzeitischämie-Protokolles entweder einen höheren oder niedrigeren Blutdruck auf als die Wildtyp-Tiere. Nach ca. 20 Minuten Ischämie waren keine signifikanten Unterschiede mehr feststellbar zwischen den transgenen und den Wildtyp-Tieren. Auch nach einwöchiger Infarzierung war der Blutdruck vergleichbar. Die Herzfrequenz war bis auf zwei Ausnahmen zu allen ausgewerteten Zeiten vergleichbar zwischen allen Mäusegruppen. Bei den Langzeitversuchen waren keine Unterschiede bezüglich des Blutdrucks und der Herzfrequenz zwischen den Tieren der Linie 1 und 2 und den Wildtyp-Tieren nachzuweisen. Von Linie 7 liegen keine Daten der Langzeitversuche vor.

Daß die drei transgenen Mäuselinien trotz unterschiedlichem Blutdruck und gleichen Herzfrequenz-Werten eine ähnliche Infarktgrößenentwicklung aufweisen, spricht gegen eine hämodynamische Einflußnahme auf die Infarktentwicklung. Es verstärkt jedoch die Hypothese eines nicht-vaskulogenen kardioprotektiven Effekts von FGF-1.

In der Literatur sind kontroverse Angaben gemacht bezüglich des Einflusses von FGFs auf den Blutdruck. Einerseits haben Cuevas et al. 1996 gezeigt, daß spontan hypertensive Ratten geringere endogene FGF-1 und -2 Konzentrationen besitzen als normotensive Ratten. Nach einer Erhöhung der FGF Konzentration in der Gefäßwand konnte die Hypertension erfolgreich korrigiert werden [167]. Die blutdrucksenkende Wirkung wurde hierbei auf den vasodilatatorischen Effekt von FGF-1 und -2 zurückgeführt [168,169]. Gleichzeitig jedoch wurde in anderen Studien gezeigt, daß die Gabe von FGF-1 keinen vasodilatatorischen [10,170], sondern einen geringgradigen vasokonstriktorischen Effekt hervorruft [171]. Zusätzlich zeigen FGF-2 knock-out Mäuse keinen höheren, sondern einen niedrigeren Blutdruck als die Kontrolltiere [172].

Eine klare Aussage darüber, warum unsere FGF-1 transgenen Mäuse unterschiedliche Blutdrücke besitzen, ist nicht möglich. Die einzige bisher bekannte Variable, die in unseren verschiedenen transgenen Linien besteht, ist das unterschiedliche transgene Konstrukt selbst. Im Unterschied zu den Tieren der Linien 1 und 2 besitzt die Linie 7 keinen CMV-Enhancer. Vermutlich hierdurch oder vielleicht auch aufgrund einer unterschiedlichen Anzahl und Lokalisation der eingebauten Kopien weisen die Tiere der Linie 1 sowohl mehr FGF-1 mRNS als auch FGF-1 Protein als die Tiere der Linie 7 auf [136]. Die Literatur gibt unseres Wissens nach keinen Hinweis darauf, daß der CMV-Enhancer den Blutdruck beeinflussen könnte. Aufgrund des bereits besprochenen Genlokalisationseffektes könnte spekuliert werden, daß dieser der Grund für die unterschiedlichen Blutdrücke sein könnte.

Leider wurde bei den Langzeitischämieversuchen nur mit Tieren der Linie 1 und 2 gearbeitet, so daß über einen möglichen Einfluß des Konstruktes der Linie 7 auf die Herzfunktionen nach einem einwöchigen akuten Infarkt nichts bekannt ist. Für eine genauere Deutung der gefunden Blutdruckunterschiede sind noch weitere Versuche notwendig.

Das Einzige was mit Sicherheit gesagt werden kann ist, daß der signifikante Blutdruckabfall zwischen den Grundwerten und vor der Okklusion auf die Eröffnung des Thorax zurückzuführen ist.

7. Elektrokardiogramm (EKG)

Ein erfolgreicher Koronarverschluß war durch Änderungen im EKG sichtbar.

Die transgenen Tiere wiesen eine signifikant höhere R-Zacke und eine verzögerte und ebenfalls erhöhte ST-Segment Erhebung im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren auf.

Bereits in den sechziger Jahren begannen Forscher den potentiellen Wert von elektrokardiografischen Ableitungen an der Maus mit Blick auf kardiovaskuläre Erkrankungen zu erkennen. 1953 veröffentlichten Richards et al. Elektrokardiogramme von adulten und neugeborenen Mäusen [173]. Zu diesem Zeitpunkt war die Erschaffung von transgenen Mäusen noch nicht möglich. Man begann jedoch bereits an Mäusen die Auswirkungen bestimmter Erkrankungen - auch im Hinblick auf das EKG - zu untersuchen [174,175].

Die erfolgreiche Okklusion läßt sich anhand des EKGs sicher nachweisen. Typischerweise zeigt sich bei einer Okklusion eine sofortige R-Zacken Erhöhung,

die gefolgt ist von weiteren spezifischen EKG-Veränderungen [138]. Dies konnten wir auch in unseren in dieser Arbeit beschriebenen Versuche deutlich zeigen.

Nach Auswertung der Infarktdaten waren wir daran interessiert zu ermitteln, ob die Kardioprotektion in den transgenen Mäusen an Veränderungen im EKG sichtbar sein würde.

Eine Erhöhung der R-Zacken Amplitude steht in direktem Zusammenhang mit einem akuten Myokardinfarkt. Bei der Maus steigt die R-Zackenhöhe bei einem akuten Myokardinfarkt innerhalb von einer Minute stark an [138]. Dieses Phänomen wurde ebenfalls auch an anderen Tieren gezeigt [176-178].

David et al. beschrieben 1982, daß die erhöhte R-Zacke während einer akuten Ischämie durch eine verzögerte elektrischen Leitfähigkeit der Purkinjefasern in dem ischämischen Gebiet erklärt werden kann [177]. Sie beschrieben nach Studien am Hund einen biphasischen Verlauf der intramyokardialen Leitung. Während zu Beginn der Ischämie die Leitfähigkeit stark ansteigt (R-Zacke wird kleiner) fällt sie innerhalb 1-2 Minuten für längere Zeit stark ab (R-Zacke wird größer). Eine mögliche Erklärung stellt die Überlegung dar, dass - ausgelöst durch eine Reduzierung der koronaren Durchblutung - ein Anstieg des intrazellulären Kalziums erfolgt und ein progressiver Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration in dem ischämischen Myokard stattfindet [179,180]. Es wurde beschrieben, daß bereits geringe Erhöhungen der interstitiellen Kaliumkonzentration ausreichend sind, um eine Erhöhung der Leitungsgeschwindigkeit zu erreichen. Im Gegensatz hierzu scheinen hohe Kaliumkonzentrationen die elektrische Leitfähigkeit zu verlangsamen und folglich für die höheren R-Zacken verantwortlich zu sein [181-183].

Dies weist auf eine dominante Rolle der Ischämie bezüglich der R-Zacken Erhöhung hin. Aufgrund der Tatsache, daß die transgenen Tiere signifikant erhöhte R-Zacken und eine verzögerte Infarktentwicklung aufwiesen, könnte spekuliert werden, daß die erhöhte R-Zacke auf eine geringere Leitungsgeschwindigkeit, verbunden mit einem geringeren Zellschaden zu Beginn der Ischämie, schließen läßt.

Eine Interpretation der unterschiedlichen Entwicklung des ST-Segments nach einem myokardialen Infarkt gestaltet sich bedeutend schwieriger. Die ST-Segment Erhöhung wird assoziiert mit einem myokardialen Gewebsuntergang nach einem Infarkt [184,185]. Während der verzögerte Anstieg, gefolgt von einer stärkeren Erhöhung, einerseits auf eine verzögerte, aber letztendlich doch massive Nekrose in den transgenen Tieren hinweisen könnte [186,187], beschrieben Birincioglu et al. 1999, daß ein kardioprotektiver Effekt nicht ablesbar ist am ST-Segment [188]. Ihrer

Veröffentlichung zufolge ist der mitochondrale K_{ATP} Kanal für eine Protektion des Myokards verantwortlich, während der sarkolemmale K_{ATP} Kanal für die ST-Segment Erhöhung zuständig ist.

Welche Hypothese für unser Mäusemodell zutreffend ist, kann mit den bisherigen Daten nicht sicher gesagt werden.

8. Herzfunktionen nach einwöchigem Infarkt

Die Überexpression von FGF-1 resultierte in einer Verschlechterung der kardialen Funktionen in den transgenen Tieren der Linie 1 und 2 im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren.

In den transgenen Tieren und in den Wildtyp-Tieren war sowohl der basale als auch der maximale Cardiac Index nach einem Myokardinfarkt geringer als in den jeweiligen Sham Gruppen. In den FGF-1 transgenen Tieren war der basale Cardiac Index sowohl in den Infarkt- als auch in den Sham-Gruppen geringer als in den Wildtyp-Tieren. Der maximale Cardiac Index war in beiden Sham-Gruppen vergleichbar. In den Infarktgruppen jedoch war der maximale Cardiac Index der transgenen Tiere geringer als der der Wildtyp-Tiere.

Die Herzfrequenz, die Blutdruckwerte und der totale periphere Widerstand der transgenen und der Wildtyp-Tiere waren vergleichbar.

Der Cardiac Index (CI) ist ein Maß für die Pumpfähigkeit und somit für die Funktionalität des Herzens. Daß die Werte der Sham-Tiere für CI-max vergleichbar waren, bedeutet, daß die transgenen Herzen die gleiche maximale Schlagvolumenkapazität und somit die gleiche maximale Herzkontraktilität (=Coronary Output) besitzen wie die Wildtyp-Tiere. Aus bisher unbekannten Gründen ist das Schlagvolumen der Tiere bei normaler Volumenbelastung (CI-basal) jedoch vermindert. Dies konnte nicht nur in den Langzeitischämie-Versuchen eine Woche nach erfolgter Sham- oder Infarkt-Operation, sondern auch in den von uns durchgeführten echokardiographischen Untersuchungen an nicht operierten Tieren nachgewiesen werden. Hierbei zeigten die FGF-1 transgenen Tiere eine signifikant reduzierte Verkürzungsfraktion (eigene Beobachtung, unveröffentlicht).

Aufgrund der Tatsache, daß der totale periphere Widerstand zwischen den transgenen und den Wildtyp-Tieren vergleichbar war, scheidet eine vaskuläre Erklärung für den verminderten Cardiac Index aus. Eine mögliche Ursache für das verminderte Schlagvolumen bei normaler Belastung könnte in einer veränderten Erregungsleitung und somit in einer unterschiedlichen Steuerung der Herzen

liegen. Diese Hypothese würde durch die unterschiedlichen EKGs nach Auslösung eines kurzzeitigen Infarktes untermauert werden. Bezüglich des EKGs nach einem einwöchigen Infarkt können kein Angaben gemacht werden.

Unsere Resultate der Herzfunktionen sind vergleichbar mit einer Studie an isolierten Rattenherzen von Padua et al. [189]. Sie zeigten in *ex vivo* Ischämie/Reperfusions-Versuchen, daß die Gabe von FGF-2 in verschlechterten Herzfunktionen resultiert. Diese Herzen zeigten jedoch eine bessere Wiederherstellung der Herzfunktionen im Vergleich zu den unbehandelten Herzen [189]. Diese Resultate lassen darauf schließen, daß sowohl FGF-1 als auch FGF-2 in physiologischen Situationen negativ inotrop, d.h. die Kontraktilität vermindernd (z.B. durch β-Rezeptorenblocker, Barbiturate und Morphine), sein könnten. Zugleich aber schützen FGF-1 und -2 das Herz während einer akuten myokardialen Ischämie/Reperfusion. Dies spricht für einen unterschiedlichen Mechanismus von FGF-1 bezüglich seiner Effekte nach einem kurzzeitigen und einem längerandauernden akuten Myokardinfarkt. Bezüglich des kurzzeitigen Effektes gehen wir von der klassischen Präkonditionierung aus. Dies wurde 1998 in der Veröffentlichung von Htun et al. für FGF-1 und -2 postuliert [10]. Wie bereits in der Literaturübersicht diskutiert, ist dies ein Prozess der nur kurzzeitig auftritt und nicht aufrecht erhalten werden kann.

Ein verminderter Cardiac Index nach einem Myokardinfarkt ist dem Zugrundegehen des infarzierten Gewebes und den hiermit verbundenen Umbauprozessen zuzuschreiben. Eine Verschlechterung der kardialen Funktionen nach einem Myokardinfarkt ist bereits anhand von anderen Studien klar beschrieben worden [142,143].

Im Gegensatz zu den transgenen Sham-Tieren war in der transgenen Infarkt-Gruppe nicht nur der basale, sondern auch der maximale Cardiac Index signifikant vermindert. Die Tatsache, daß der totale periphere Widerstand der Transgenen mit dem der Wildtyp-Tiere vergleichbar war, spricht eher für ein vermindertes Schlagvolumen als für eine veränderte Gefäßantwort in den Transgenen.

Die verschlechterte Wiederherstellung der Herzfunktionen in den transgenen Tieren kann durch einen inadäquaten Gewebeumbau nach einem Myokardinfarkt erklärt werden. Dieser beeinflußte die Herzarchitektur negativ und be-, bzw. verhinderte hierdurch die Ausbildung einer effektiven Kontraktions-Struktur. Hierfür spricht auch, daß die Kollagenablagerung in der infarzierten freien Wand des linken Ventrikels in den transgenen Herzen nach einem einwöchigen Myokardinfarkt geringer war und die Septen dicker, hypertroph, waren [190]. Dies bedeutet, daß das infarzierte Gebiet der Transgenen nicht adäquat abgebaut wird

und hierdurch das Herz die Auswirkungen eines Infarktes auf die Herzfunktionen nicht mehr in vernünftigem Maße kompensieren kann. Dies führt zu einer verminderten Herzkontraktilität und somit zu einem geringeren Cardiac Output.

Da die Apoptose in den transgenen Tieren nach einem Infarkt höher war als in den Wildtyp-Tieren und bekannt ist, daß apoptotische Gebiete im Gegensatz zu nekrotischen Gebieten scharf gegen das restliche Gewebe abgegrenzt sind und in apoptotischen Gebieten kaum Anzeichen von inflammatorischen Zellen gefunden werden können [152], kann diese ebenfalls direkt mit dem negativen Gewebeumbauprozess in Zusammenhang gebracht werden.

9. Endogenes / Exogenes FGF-1

Bei den in der vorliegenden Arbeit diskutierten Resultaten handelt es sich um Auswirkungen von endogenem FGF-1. Im Vergleich der Resultate bezüglich der Wirkung von FGF-1 in unserem transgenen Mäusemodell mit denen anderer Studien, muß deutlich zwischen dem Effekt von endogenem und exogenem FGF-1 unterschieden werden. Eine der ersten Veröffentlichungen, die Unterschiede zwischen den Auswirkungen nach Gabe von FGF-1, exogenes FGF-1, und von einem Vorhandensein von FGF-1 im Tier, bzw. in der Zelle selbst, endogenes FGF-1, diskutiert hat, war die 1994 erschienene Arbeit von Renaud et al. Sie postulierten darin, daß endogenes FGF-1 einen zellschützenden Effekt hat, während exogenes FGF-1 einen mitogenen Effekt ausübt [16].

Auch bei der Untersuchung der Wiederherstellung der Herzfunktionen scheint es Unterschiede zu geben zwischen den Effekten von exogenem und endogenem FGF-1. Die Herzfunktionen waren als Folge einer vermehrten Bildung von Kollateralen in experimentellen Studien mit chronischer Ischämie nach Gabe von exogenen FGFs verbessert [191]. Zusätzlich haben FGFs bei einem akuten Infarkt *in vivo* direkte positive Effekte auf die Herzfunktionen gezeigt [192]. Während endogenes FGF-1 ebenfalls in der Lage ist, einen positiven Einfluß auf die Wiederherstellung der kardialen Funktionen nach Ischämie/Reperfusion in einem *ex vivo* Experiment auszuüben [193], ist dies nach einem längeren akuten Myokardinfarkt nicht der Fall. Dies hängt mit dem fehlenden angiogenen/arteriogenen Effekt von endogenem FGF-1 zusammen.

Die Mehrheit aller Studien an Tieren oder Menschen zeigten, daß die Gabe von FGF-1 und die Gabe, bzw. Überexpression von FGF-2 einen nützlichen, positiven Effekt in Situationen von akuter [10,13,157] und chronischer Ischämie [11,92-94,164-166,191,194,195] durch ihre Induzierung von Kollateralwachstum und eine Verbesserung der

Herzfunktionen ausüben. Unsere Studie zeigt, daß bei kurzzeitiger Ischämie durchaus ein positiver, kardioprotektiver Effekt von FGF-1 vorhanden ist. Dieser ist jedoch nicht von langer Dauer. Bei länger andauernder Ischämie scheint eine konstitutive Überexpression von FGF-1 sogar nachteilig bzw. schädlich zu sein für einen adäquaten Umbau des Herzgewebes. Dies wiederum führt zu gegensätzlichen Effekten der Herzleistung. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese zeigte ein Wundheilungsmodell der Haut, daß die Anwesenheit von FGF-2 für eine kurze Zeitspanne vorteilig ist für die Wundheilung. Eine chronisch erhöhte FGF-2 Konzentration beeinträchtigt jedoch den Wundheilungsprozess [196,197].

10. MAPKinasen / Signaltransduktionsweg

Nachdem wir nachgewiesen hatten, daß bei den transgenen Tieren ein vorübergehender Schutz gegenüber der Infarktentwicklung vorhanden ist, ging es uns um die Frage, welche Mechanismen hieran beteiligt sein würden. Anhand der transgenen Mäuse konnten wir zeigen, daß die aktivierte Form der MAPKinasen ERK-1 und -2 (P-ERK-1 und -2) in den Herzen dieser Tiere konstitutiv vermehrt vorhanden ist. Die Expression war bereits ohne Ischämie mengenmäßig vergleichbar mit der im ischämischem Myokard von Wildtyp-Tieren. Die Menge an nicht-phosphoryliertem ERK-1 und -2 wies keine Unterschiede zwischen den transgenen und den Wildtyp-Tieren auf.

Nach Injektion von UO126 wurde eine teilweise Aufhebung des kardioprotektiven Effekts beobachtet. Dies bedeutet, daß ERK-1 und -2 maßgeblich an dem kardioprotektiven Effekt von FGF-1 beteiligt sind, während Angiogenese und Arteriogenese vermutlich nur eine untergeordnete Rolle bei der Kardioprotektion spielen.

Der molekuläre Mechanismus dieses Schutzeffektes wird unter anderem durch Tyrosin Kinase Rezeptoren vermittelt. FGF-1 und -2 binden an die gleichen Tyrosin Kinase Rezeptoren (FGFR-1 bis -4) [198,199]. Sie binden gleichermaßen an FGFR-1 und -2 und Kreuzphosphorylierung zwischen den heterologen FGFs wurde bereits beschrieben [200]. Es wird angenommen, daß Tyrosin Kinase gekoppelte Rezeptoren Mediatoren der Ischämische Präkonditionierung sind. Dies liegt nahe, da bereits gezeigt werden konnte, daß die Hemmung dieser Rezeptoren eine myokardiale Protektion verhindert [201]. Außerdem konnten wir zeigen, daß durch die Hemmung der Tyrosin Kinase der kardioprotektive Effekt von exogenem FGF-1 auf das Schweineherz aufgehoben wird [10].

Aufgrund der Tatsache, daß endogenes FGF keine Sequenz besitzt, die eine Sekretion ermöglicht [196], und daß frühere Experimente nur exogenes FGF-1 benutzt haben, das an einen Rezeptor an der Außenseite der Zellmembran bindet, schien es von Interesse zu sein, die Überexpression von intrazellulärem FGF-1 anhand unseres Mäusemodells zu untersuchen.

Ein Signaltransduktionsweg, der schon länger von uns untersucht wird, ist der der MAPKinasen ERK-1 und ERK-2. MAPKinasen sind wichtige Mediatoren der Signaltransduktion von der Zelloberfläche zum Zellkern. Sie sind unter anderem an der Antwort auf Zellstressoren wie z.B. Hypoxie oder Ischämie, aber auch an der Regulation von zellulärer Hyperthrophie beteiligt. Sowohl FGFs als auch andere Wachstumsfaktoren sind in der Lage, die Aktivierung der ERKs in ischämischem Myokard zu stimulieren [202].

Die FGF-Liganden-Bindung induziert eine Rezeptor Dimerization, die in einer Auto-Phosphorylation der intrazellulären Tyrosin-Reste resultiert. Ebenfalls induziert sie eine “downstream signaling” über die MAPKinasen ERK-1 und ERK-2, die in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren resultiert [202]. Barancik et al. [203] konnten nicht nur zeigen, daß durch kurze Ischämie-Phasen und FGF-1 die MAPKinasen ERK-1 und -2 aufreguliert und aktiviert werden, sondern auch, daß diese maßgeblich an der kardialen Protektion von exogenem FGF-1 beteiligt sind. Darum war es unsere Hypothese, daß die ERK-Kaskade auch an der Kardioprotektion in unserem transgenen Mäusemodell beteiligt sein würde.

Nach Hemmung der Phosphorylierung von ERK-1 und -2 mit dem spezifischen Inhibitor UO126 nahmen die Infarktgrößen in den transgenen Tieren signifikant zu. Die Infarkte erreichten jedoch nicht die Ausmaße wie wir sie ohne diese Substanz ermitteln konnten. Die alleinige Gabe des Lösungsmittels zeigte keinerlei Auswirkungen auf die Infarktgröße. Desweiteren ergab die Verabreichung von UO126 an die Wildtyp-Tiere keine nennenswerten Veränderung der Infarktgrößen. Dies zeigt, daß allein UO126 für die teilweise Aufhebung der Protektion verantwortlich ist. Dies stimmt überein mit früheren Versuchen aus unserem Hause. Hierbei konnten wir an Schweinen zeigen, daß eine Blockade der Aktivierung von ERK-1 und ERK-2 durch entweder PD98059 oder UO126 die frühe Form der Ischämischen Präkonditionierung hemmt. Die Infarkte waren hierbei nach einer langen Index-Ischämie größer als die von nicht-konditionierten Kontrolltieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht nur der Effekt von UO126 auf die Infarktgröße untersucht, sondern auch die Expression von P-ERK-1 und P-ERK-2 nach Gabe von UO126 bestimmt. Hier spiegelten sich die Auswirkungen von

UO126 auf die Infarktgröße in einer Verminderung von P-ERK-1 und P-ERK-2 in den transgenen Tieren wider. Bei den Wildtyp-Tieren wies die Injektion von UO126 keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Expression von P-ERK-1 und -2 auf.

Die größeren Infarkte und die geringere Menge an P-ERK-1 und -2 nach Gabe von UO126 sprechen dafür, daß es sich bei der Protektion in unserem Mäusemodell um die klassische Form der Ischämischen Präkonditionierung handelt, und daß diese zumindest teilweise via ERK-1 und ERK-2 verläuft. Ferner spricht es auch dafür, daß die Ischämische Präkonditionierung zumindest teilweise von Transkriptionsfaktoren vermittelt wird [202]. Die Tatsache, daß wir mit UO126 keine vollständige Aufhebung der Schutzwirkung des Transgens erreichen konnten, läßt sich einerseits durch die komplexe und multifaktorielle Protektions-Kaskade von FGF-1 erklären [204]. Andererseits haben wir bei unseren Versuchen mit einer Inhibition gearbeitet, die vermutlich weniger als 100% betrug. Eine höhere Gabe von UO126 war jedoch für die Tiere tödlich (eigene Beobachtung).

11. Zusammenfassung / Schlußfolgerung

In unseren Versuchen konnten wir zeigen, daß die transgene Überexpression von FGF-1 zu einer konstitutiven Aktivierung des ERK-Pathways führt. Wir sind der Überzeugung, daß dies einer der molekulären Wege der Protektion gegen myokardiale Ischämie ist. Schließlich hat seine Hemmung durch UO126 den schützenden Effekt von FGF-1 zu einem großen Teil außer Kraft gesetzt. Es kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei dem beobachteten Schutzmechanismus um die klassische Form der Ischämischen Präkonditionierung handelt.

Die Tatsache, daß die maximale Infarktgröße bei den transgenen Tieren verzögert auftritt, aber letztendlich nicht reduziert wurde, indiziert, daß der anti-ischämische Effekt von FGF-1 nicht zurückzuführen ist auf eine aufrecht erhaltene Perfusion einer vermehrten Anzahl von Arteriolen. Es handelt sich folglich nicht um funktionelle Kollateralen.

Daß die Herzen der transgenen Tiere keine vermehrte Angiogenese aufwiesen und auch nach einer einwöchigen akuten Okklusion die Kapillardichte nicht von der der Wildtyp-Tiere zu unterscheiden war, deutet außerdem darauf hin, daß endogenes FGF-1 eine untergeordnete Rolle bei der Angiogenese spielt.

Somit unterstützt die vorliegende Studie unsere Hypothese, daß es sich bei dem protektiven Effekt von FGF-1 um einen nicht-angiogenen Effekt handelt und daß endogenes FGF-1 eine vorwiegende arteriogene Rolle besitzt.

Betrachtet man die bisherigen Ergebnisse von FGF-1 im Bezug auf eine mögliche klinische Nutzung so zeigt sich, daß FGF-1 einen gewissen Schutz bietet, dieser jedoch nicht ausreichend ist für eine Infarktprävention. Desweiteren resultierte die Überexpression von FGF-1 in einem veränderten kardialen Umbau nach einem myokardialen Infarkt. Dies scheint eher eine Verschlechterung als einen Erhalt der kardialen Funktionen zur Folge zu haben.

Zum bisherigen Zeitpunkt und mit dem bisherigen Wissensstand kann eine Gentherapie mit alleiniger Gabe von FGF-1 nicht empfohlen werden. Vielmehr sollte diese Substanz bezüglich ihrer Wirkungsweise noch genauer untersucht werden und eine Anwendung in der Gentherapie kritisch betrachtet werden.

12. Zukunftsaussichten

Die Ergebnisse dieser Studie sind von Bedeutung für geplante klinische Versuchsreihen mit Wachstumsfaktoren. Potentiell positive Effekte von Wachstumsfaktoren hängen nicht nötigerweise vom Vorhandensein von Wachstumsfaktoren ab. Wichtigere Parameter könnten der Zeitrahmen spielen, in dem Wachstumsfaktoren hochreguliert sind und das Vorhandensein ihrer Rezeptoren.

Anhand des FGF-1 transgenen Mäusemodells besteht nun erstmals die Möglichkeit, die Auswirkungen einer permanent erhöht vorkommenden Menge an endogenem FGF-1 im Herzen näher zu untersuchen. Somit können auch die von FGF-1 regulierten Signaltransduktionswege genauer erforscht werden. Bisher konnten wir bereits eine Beteiligung der MAPKinasen an der Kardioprotektion nachweisen. Zusammen mit unseren Kollegen aus Maastricht sind wir augenblicklich damit beschäftigt, auch andere Signaltransduktionswege zu identifizieren. Erste Resultate zeigten bereits eine Involvierung des FGF-Rezeptors-1, der Proteinkinase C und der Tyrosin Kinasen [193].

Ebenfalls interessant wäre die Kreuzung der FGF-1 und der FGF-2 transgenen Mäuse. Diese beiden Transgenosen lassen einen unterschiedlichen Effekt von FGF-1 und FGF-2 auf das Gefäßwachstum vermuten. Es wäre theoretisch durchaus denkbar, daß in den hierdurch entstehenden doppeltransgenen Mäusen sowohl mehr Kapillaren als auch mehr Arteriolen vorhanden sein würden. Dies könnte unter Umständen in einer verbesserten Durchblutung und eventuell auch in kleineren Risikogebieten nach einem Infarkt resultieren. Man geht schon seit längerer Zeit davon aus, daß nicht ein einziger, sondern eine Kombination von verschiedenen Wachstumsfaktoren für die Behandlung von Herzinfarkten besser

geeignet wäre. Bisher ist es außerdem meist nur möglich, ein vermehrtes Kapillarwachstum, aber keine vermehrte Arteriogenese durch die Gentherapie zu erzeugen. Kapillaren alleine sind jedoch nicht ausreichend, um auf Dauer eine gute Durchblutung zu gewährleisten. Hierfür sind Arteriolen, bzw. nicht permeable und funktionelle Kollateralen nötig.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Die Koronare Herzerkrankung ist eine weit verbreitete Erkrankung in vielen Ländern der Welt. In den Industrieländern ist sie eine der häufigsten Erkrankungen. Die Wahrscheinlichkeit, bleibende Schäden davonzutragen, bzw. dieser Erkrankung zu erliegen ist sehr hoch.

Eine der Hauptfolgen der Koronaren Herzerkrankung ist der myokardiale Infarkt. Um in der Lage zu sein, ein geeignetes und effektives Mittel hiergegen zu entwickeln, ist es unabdingbar, die Pathophysiologie und die ihr zugrunde liegenden Mechanismen genau zu kennen.

Eine seit einiger Zeit stark diskutierte mögliche Therapieform stellt die Applikation von Wachstumsfaktoren dar. Bisher waren die meisten Studien auf die Gabe von exogenen Wachstumsfaktoren fokusiert. Im Gegensatz hierzu ist über die Effekte von endogenen Wachstumsfaktoren wenig bekannt. Erste Versuche lassen jedoch vermuten, daß Unterschiede zwischen endogenen und exogenen Wachstumsfaktoren bestehen.

Einer der in Frage kommenden Wachstumsfaktoren ist der saure Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF-1). Die hier vorliegende Doktorarbeit basiert auf zwei Fragen: Erstens, würde eine permanente Überexpression von FGF-1 noch stets kardioprotektiv sein und falls ja, wie lange? Und zweitens, würde diese Kardioprotektion durch einen angiogenen oder durch einen trophischen Effekt ausgelöst werden?

Um diese Fragen zu klären, wurden im Vorfeld transgene Mäuse entwickelt, die das humane FGF-1 herzspezifisch überexprimieren. Diese Mäuse waren lebensfähig, zeigten eine normale Entwicklung und vergleichbare Zuchtresultate. Bezüglich der Anatomie, der Histomorphologie und der Ultrastruktur zeigten diese transgenen Mäuse keine wesentlichen Abweichungen. Während die kapilläre Dichte vergleichbar war, wiesen die transgenen Tiere mehr Koronararterien auf. Vorallem die Arteriolen wiesen eine erhöhte Dichte auf. Außerdem waren in den transgenen Tieren mehr Abzweigungen von den Haupt-Koronarien nachweisbar. Zusätzlich war die Koronarperfusion am isolierten Herzen in den transgenen Tieren erhöht. Diese Resultate zeigen bereits, daß FGF-1 eine wichtige Rolle in der Differenzierung und dem Wachstum des koronären Systems besitzt. Es läßt auch den Schluß zu, daß FGF-1 eines der hauptverantwortlichen regulatorischen Moleküle bei der Differenzierung des arteriellen Systems ist [136]. Desweiteren konnte mit diesem transgenen Modell deutlich gezeigt werden, daß endogenes FGF-1 zumindest bei Normoxie keinen angiogenen Effekt hat.

Um unsere Hypothese eines nicht-vaskulogenen kardioprotektiven Effekts von FGF-1 zu überprüfen, wurden diese FGF-1 transgenen Mäuse entweder einer kurzen lokalen ischämischen Periode von 15-75 Minuten oder einer einwöchigen lokalen Ischämie ausgesetzt. Wir fanden eine deutlich verzögerte Infarktentwicklung in den transgenen Mäusen im Vergleich zu ihren nicht-transgenen Wurfgeschwistern. Während in den Wildtyp-Tieren erste Infarkte schon nach 15 Minuten sichtbar waren, war dies in den transgenen Tieren erst nach 45 Minuten der Fall. Die maximale Infarktgröße von ca. 60% des Risikogebietes war in beiden Genotypen vergleichbar. Während diese in den Wildtyp-Tieren bereits nach 45 Minuten Ischämie nachweisbar war, benötigten die transgenen Tiere 75 Minuten um gleiche Infarktgrößen auszubilden. Diese Verzögerung in der Infarktentwicklung wurde ebenfalls in *in vitro* Versuchen deutlich beschrieben. Hierbei zeigten adulte Kardiomyozyten eine signifikant geringere Freisetzung von Kreatin Kinase (CK) und Laktat Dehydrogenase (LDH) [150].

Die verzögerte Infarktentwicklung kann zumindest teilweise einer konstitutiv erhöhten Expression der extrazellulär signal-regulierten Kinasen ERK-1 und ERK-2 zugeschrieben werden. Diese sind in den transgenen Herzen bereits ohne Ischämie zu einem höheren Prozentsatz aktiviert. Zusätzlich resultierte die Injektion des ERK-1/-2 Inhibitors UO126 in einer Abschwächung des kardioprotektiven Effekts von FGF-1. In früheren Experimenten konnte bereits gezeigt werden, daß ERK-1 und ERK-2 eine wesentliche Rolle in der ischämischen Präkonditionierung spielen.

Da eine angiogene/arteriogene Wirkungsweise zu einer Reduzierung der maximalen Infarktgröße aufgrund eines erhöhten Koronarflusses hätte führen müssen (die arterioläre Dichte war in den transgenen Herzen erhöht), gehen wir davon aus, daß die Kardioprotektion auf einen nicht-vaskulären Effekt zurück zu führen ist.

Anhand von Tiere mit einwöchiger lokaler Ischämie untersuchten wir den Einfluß einer konstitutiven kardialen Überexpression von FGF-1 auf die Herzfunktionen und das Remodeling im Wundgewebe und dem übrigen Myokard. Der kardiale Index (CI) sank sowohl in der transgenen als auch in der Wildtyp-Gruppe nach dem experimentellen Eingriff ab. In den FGF/MI Tieren waren sowohl der basale als auch der maximale CI niedriger als in den Wildtyp-Tieren. Bezüglich der kapillären Dichte konnten wir keine Unterschiede zwischen den Genotypen beobachten. Die Tatsache, daß die kardialen Myozyten der transgenen Tiere eine geringere Dichte bei einer gleichzeitigen Größenzunahme aufwiesen, weist auf eine hypertrophe Antwort des nicht-infarzierten Gewebes hin. Zusätzlich konnten in den FGF-1 transgenen Tieren höhere Apoptoseraten und geringere Kollageneinlagerungen im Wundgewebe nachgewiesen werden. Die DNS Synthese wies jedoch keine

Unterschiede auf [190]. Daher schlußfolgern wir, daß die kardiale Überexpression eine Verschlechterung der Herzfunktionen und eine Veränderung des kardialen Umbaus nach einem einwöchigen experimentellen Infarkt bewirkt.

Zusammenfassend können wir sagen, daß eine konstitutive, herzspezifische Überexpression von FGF-1 einen kardioprotektiven Effekt ausübt und das Überleben der Zellen erhöht. Für diesen protektiven Mechanismus wird der Signaltransduktionsweg der ischämischen Präkonditionierung genutzt. Zusätzlich verschlechtert es jedoch die funktionelle Wiederherstellung des Herzens nach einem längeren myokardialen Infarkt.

Bisher zeigten die meisten tierexperimentellen und klinischen Studien, daß sowohl die Gabe von FGF-1, als auch die Gabe oder Überexpression von FGF-2, eine positive Wirkung während einer kardialen Ischämie haben. Über die Effekte von FGF-1 bei Gabe zu Beginn der Reperfusion ist jedoch noch nichts bekannt. Für eine Behandlung von Patienten nach einem akuten Herzinfarkt ist dies jedoch Voraussetzung. Gesetzt den Fall, daß die Gabe von FGF-1 auch nach einer Wiederherstellung des Koronarflusses vorteilhaft wäre, könnte es z.B. zusätzlich zur thrombolytischen Therapie gegeben werden. Dies könnte von Vorteil sein, da bereits bekannt ist, daß nicht nur die Ischämie selbst, sondern - in einem höheren Maße sogar - die einer Ischämie folgende Reperfusion Schaden in dem Risikogebiet induziert. Die Gabe von FGF-1 könnte hierbei u.U. die Infarktgröße reduzieren und die Wiederherstellung der Herzfunktionen günstig beeinflussen.

Im Gegensatz hierzu ist ein positiver Effekt von endogenem FGF-1 in Patienten, die an einem akuten Myokardinfarkt leiden, fraglich. Unsere Daten zeigen nämlich neben einer deutlichen Verzögerung der Infarktentwicklung auch einen nicht zu unterschätzenden negativen Effekt - die deutliche Verschlechterung des myokardialen Umbaus und der Herzfunktionen.

Zusätzlich bietet unser Mäusemodell ein gute Möglichkeit, um die Signalkaskade von FGF-1 besser und genauer zu erforschen. Zusammen mit unseren Kollegen in Maastricht waren wir bereits in der Lage zu zeigen, daß der kardioprotektive Effekt in unserem transgenen Mäusemodell weder an einen angiogenen noch an einen arteriogenen Mechanismus zu koppeln ist. Wir konnten jedoch zeigen, daß der kardioprotektive Effekt FGF-Rezeptor-1 vermittelt ist, während dies bei der durch FGF-1 ausgelösten Zellprotektion nicht der Fall ist [193]. Desweiteren konnten wir nachweisen, daß der kardioprotektive Effekt dem der ischämischen Präkonditionierung ähnelt, und sowohl der FGF-Rezeptor 1, als auch die Protein Kinase C, die Tyrosin Kinasen und die MAPKinasen ERK-1 und -2 hieran beteiligt sind [10,150,193].

VIII. SUMMARY

Heart failure is a common syndrome with an increasing incidence and prevalence. It is already one of the leading causes of morbidity, disability and mortality in the developed world. One of the major causes of heart failure is myocardial infarction. Understanding of the pathophysiology and underlying mechanisms is imperative and a major requirement for the development of adequate therapy. One possible therapy that is discussed is the application of growth factors. Most studies on this subject have focused on the effects of application of exogenous growth factors. In contrast little is known about the effect of endogenous growth factors. However, first results suggested that there would be differences between endogenous en exogenous ones. One of the discussed growth factors is fibroblast growth factor-1 (FGF-1). The present thesis focuses on two different subjects: First, would a permanent overexpression of FGF-1 still be protective and for what timeperiod? And second, would this be mediated by an angiogenic effect or as we hypothesized by a trophic effect.

Therefore we generated transgenic mice with a cardiac specific overexpression of the human FGF-1. These mice were viable, showed a normal development and breeding results. Anatomic, histomorphological, and ultrastructural analyses revealed no major morphological or developmental abnormalities of transgenic hearts. Capillary density was unaltered, whereas the density of coronary arteries and especially, arterioles, was significantly increased, as was the number of branches of the main coronary arteries. In addition the coronary flow was significantly enhanced in transgenic mice *ex vivo*. These findings already demonstrated an important role of FGF-1 in the differentiation and growth of the coronary system and suggested that it is a key regulatory molecule of the differentiation of the arterial system [136]. Furthermore it has already been shown that in animals without ischemia endogenous FGF-1 has no angiogenic effect.

To test our hypothesis of a non-vascular cardiac protective mechanism of FGF-1 these mice underwent an ischemic period of 15-75 minutes or one week. What we found was a markedly delayed infarct development in the transgenic mice with first signs of myocardial infarction visible at 45 minutes after coronary artery ligation whereas wildtype animals developed myocardial necrosis already after 15 minutes of ischemia. Maximal infarct size (60% of risk area) did not differ, but transgenics reached maximal infarction after 75 minutes compared to 45 minutes in wildtype animals. The *in vitro* study using adult cardiac myocytes confirmed this delay by showing a significantly attenuated release of creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) [150].

The delay in infarct development is partially due to a constitutive expression of the extracellular signal-regulated kinases ERK-1 and -2, since they are significantly more activated from an already higher basic level in the myocardium of transgenics. Additionally, injection of the ERK-1/-2 inhibitor UO126 decreased the cardioprotective effect of FGF-1. In earlier experiments it has already been shown that ERK-1 and -2 are one of the major components of ischemic preconditioning.

Since an angiogenic/arteriogenic mode of action should have reduced the final infarct size due to enhanced collateral flow (coronary density was increased in transgenics), these results imply a non-vascular cardioprotective mechanism.

After one week of occlusion we investigated the effects of the constitutive cardiac-specific overexpression on cardiac function and remodeling of the scar tissue and remote myocardium. The cardiac index (CI) decreased in both experimental groups after myocardial infarction. In FGF/MI animals, both basal CI and CI after volume loading were lower in comparison with wildtype littermates. The capillary densities did not differ between the wildtype and the transgenic animals. The fact that the cardiac myocytes showed a decrease in density and increased in size in the transgenic mice after a myocardial infarction indicates an enhanced hypertrophic response of the remote myocardium. In addition, higher apoptosis rates and lower collagen content were found in the scar tissue of FGF-1 transgenic mice, while DNA synthesis in the scar tissue was not different [190]. Therefore we conclude that cardiac-specific FGF-1 overexpression induces deterioration of cardiac function and an altered cardiac remodeling response following chronic experimental myocardial infarction.

In summary we conclude that the constitutive cardiac specific overexpression of FGF-1 induces cardioprotection and improves cell survival, thereby mimicking ischemic preconditioning. But additionally it lowers the functional recovery of the heart after chronic myocardial infarction.

In the majority of both, animal and human studies, FGF-1 administration and FGF-2 administration or overexpression were demonstrated to be beneficial for the heart in situations of acute ischemia. However, until now little is known about the effects of FGF-1 given at the onset of reperfusion. This would be important to know for treatment of patients suffering from an acute myocardial infarction. If administration of FGF-1 would also be beneficial after restoration it could e.g. be given together with the thrombolytic therapy, since it has been proven that not only ischemia itself but, even more pronounced, the subsequent reperfusion induces damage to the myocardial area at risk. This could reduce the infarct size and improve cardiac functional recovery.

In contrast, the positive effect of endogenous FGF-1 for a patient suffering from an acute myocardial infarction remains questionable. Although our data show a clear delay in infarct size development the outcome after a myocardial infarction seems to be worth regarding the deterioration in myocardial remodeling and heart functions.

Additionally, our transgenic mouse model provides a good tool for studying the underlying mechanisms of FGF-1. Our collaborators in Maastricht and we were already able to show in this transgenic mouse model that the cardioprotective effect of endogenous FGF-1 is neither related to an angiogenic nor an arteriogenic mechanism. In fact the cardioprotective effect is FGF-receptor 1 mediated but in contrast the FGF-1 mediated protection of cell survival is not [193]. Furthermore it revealed that the cardioprotective effect, mimicking ischemic preconditioning, involves FGF-receptor 1, Protein Kinase C, Tyrosine Kinases and further downstream also the MAPKinases ERK-1 and -2 [10,150,193].

IX. Abkürzungen

-/-	knock-out Maus
aFGF	acidic FGF; deutsch: saures FGF
BP	Bandpassfilter
BS-I	Bandeiraea simplicifolia I
CARIM	Cardiovascular Research Institute Maastricht
CD	capillary density; deutsch: Kapillardichte
CD2F1	spezieller Mäusestamm (nicht transgen)
cDNS	copy DNS
CI	cardiac index (CI=CO/Körpergewicht)
CMV	Cytomegalovirus
CO	cardiac output; deutsch: Herzauswurfrate
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EKG	Elektrokardiogramm
Erk	extracellular signal-regulated kinases; deutsch: extrazellulär signal-regulierte Kinasen
FGF	fibroblast growth factor; deutsch: Fibroblasten Wachstumsfaktor
FGFR	FGF-Rezeptor
gDNS	gemonische DNS
HR	heart rate; deutsch: Herzschlagfrequenz
IA	infarct area; deutsch: Infarktgebiet
ID	inner diameter; deutsch: Innendurchmesser
IgG	Immunglobulin G
I/R	Ischämie/Reperfusion
K	Kontrolle
kb	kilo Basenpaare
KD	Krebs Henseleid Puffer / DMSO
kDa	kilo Dalton
kHz	kilo Herz (60.000/minute)
L1	Linie 1 der FGF-1 transgenen Mäuse
L2	Linie 2 der FGF-1 transgenen Mäuse
L7	Linie 7 der FGF-1 transgenen Mäuse
LAD	left anterior descending arterie
LV	Linker Ventrikel
LVFWTh	left ventricular free wall thickness; deutsch: Dicke der freien Wand des linken Ventrikels
MABP	mean arterial blood pressure mittlerer Blutdruck
MAPK	mitogen activated protein kinase

MEK	MAPK/Erk Kinase
MI	Myokardialer Infarkt
MLC2v	myosin light chain 2v
mm Hg	milli Meter Quecksilbersäule
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
m/v	Masse pro Volumen
n	number; deutsch: Anzahl
NaCl	Natriumchlorid; deutsch: Kochsalz
NRA	non risc area; deutsch: Nicht-Risiko Gebiet
OD	outer diameter; deutsch: Außendurchmesser
PBS	phosphate buffered saline; deutsch: Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction; deutsch: Polymerase-Kettenreaktion
PE	Polyethylen
P-ERK	phosphoryliertes ERK
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI	Propidium Iodid
RA	Risc Area; deutsch: Risikogebiet
RNAse	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat; deutsch: Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	standard error of the mean; deutsch: Standardfehler
SSC	NaCl/Natriumacetat
STh	septum thickness; deutsch: Septumdicke
StreptABC^{HRP}	StreptAvidin-Biotin-Complex markiert mit horse raddish peroxidase
TBS	tris buffered saline; deutsch: Tris-gepufferte NaCl-Lösung
TG	transgen
TPR	totale periphere Resistenz
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	Thioflavin S
TTC	Triphenyltetrazolium Chlorid
TUNEL	terminal transferase dUTP nick end labeling
UO126	1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenyl-thio]butadiene
VEGF	vascular endothelial growth factor
WT	Wildtyp
w/v	weight per volume; deutsch: Gewicht pro Volumen

X. Anhang

1. Mäusemodell

In dem vorliegenden Kapitel wird kurz die erfolgreiche Herstellung der FGF-1 transgenen Mäuse und der histologische Phänotyp des Herzens besprochen werden [136].

1.1. Genetischer Hintergrund der transgenen Mäuselinien

Um die Auswirkungen einer permanenten Überexpression des Fibroblasten Wachstumsfaktors FGF-1 auf die Herzgefäßanatomie und die Infarktentwicklung zu studieren, wurden transgene Mäuse, die das humane FGF-1 im Herzen überexpremieren, konstruiert.

Verantwortlich für die Entwicklung der Konstrukte und der transgenen Mäuse waren Dr. Wolfgang M. Franz (Medizinische Universität zu Lübeck, Medizinische Klinik II, Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck), Dr. Heiner Niemann (Institut für Tierzucht und Tierverhalten, Abteilung Biotechnologie, Mariensee, 31535 Neustadt), Dr. René Zimmermann (Max-Planck-Institut / Kerckhoff Klinik, Benekestraße 2, 61231 Bad Nauheim) und Prof. Wolfgang Schaper (Max-Planck-Institut, Benekestraße 2, 61231 Bad Nauheim).

Die Arbeiten wurden in der Abteilung der Experimentellen Kardiologie des Max-Planck-Institutes Bad Nauheim in der Arbeitsgruppe von Dr. René Zimmermann und unter der Leitung von Herrn Prof. Wolfgang Schaper durchgeführt.

Das FGF-1 Transgen wurde aufgebaut wie unter Abbildung 21 gezeigt. Ein 2.2 kb Eco RI Fragment des Klons pHBGF1.3A, der die kodierende und 3' Sequenz des humanen FGF-1 enthielt, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. I.M. Chiu, Ohio State University, Columbus, Ohio, USA, wurde an seinem 3' Ende mit dem SV40-Poly(A)-Intron verbunden. 5' der FGF-1 cDNS wurde der 2.2 kb große Mäuse MLC2v Promotor (Plasmid MLC2v/FGF), beschrieben von Franz et al. [205], hinzugefügt. Der MLC2v Promotor ist verantwortlich für die herzspezifische Expression des Transgens. Um eine erhöhte Expression des Transgens zu erreichen, wurde der CMV-Enhancer 5' des MLC2v-Promotors ligiert. Daraus resultierte ein 6.0 kb Sac I-Fragment, welches in Bluescript II SK kloniert wurde und das CMV/MLC2v/FGF-1/SV40 Plasmid ergab. Alle Konstrukte wurden durch automatisierte Sequenzierung in einem A.L.F. Sequenzer und durch

Restriktionskartierung in Übereinstimmung mit Standardmethoden überprüft. Bei der Herstellung des zweiten Konstruktes wurde auf den CMV-Enhancer verzichtet. Dies ergab somit ein MLC2v/FGF-1/SV40 Plasmid. Ansonsten wurden die gleichen Verfahren bei der Herstellung des Konstruktes angewendet.

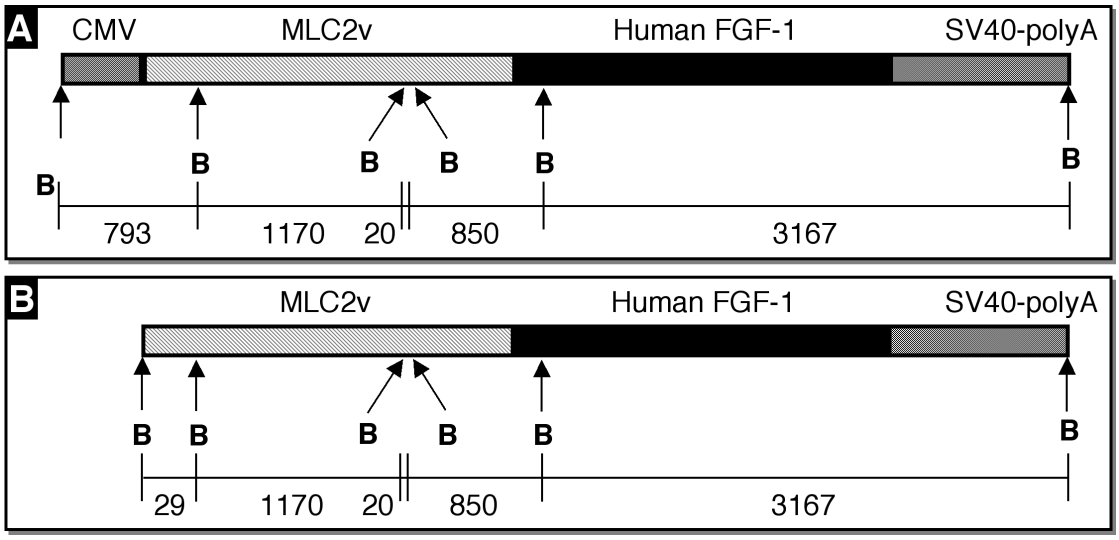

*Abb. 21 Aufbau der beiden Konstrukte CMV/MLC2v/FGF-1/SV40 (**A**) und MLC2v/FGF-1/SV40 (**B**). Linie 1 und 2 besitzen Konstrukt **A**, während in Linie 7 Konstrukt **B** nachweisbar ist. B= Bam H1*

Der Gentransfer wurde in Übereinstimmung mit den gängigen Methoden der Mikroinjektion durchgeführt. Die Mikroinjektion des Transgens in die Zygoten und der Transfer in die Ovidukte der pseudograviden Stammütter resultierten in der Erschaffung von sieben transgenen Stammtieren aus denen transgene Mäuselinien (L1-L7) generiert werden konnten. Alles Mäusematerial stammte von CD2F1 Mäusen.

Alle Nachkommen wurden auf die Vererbung des Transgens hin getestet. Dies erfolgte durch Southern Blot Analyse oder durch eine genomische Polymerase Ketten Reaktion (PCR: polymerase chain reaction) in Übereinstimmung zu den Hersteller-Instruktionen.

Von den insgesamt sieben transgenen Linien wurden drei als Ausgangspunkt für die Zucht der in dieser Studie verwendeten transgenen und nicht-transgenen Wurfgeschwister verwendet. Linie 1 und 2 besitzen das CMV/MLC2v/FGF-1/SV40 Konstrukt, während in Linie 7 das MLC2v/FGF-1/SV40 Konstrukt nachweisbar ist.

Die transgenen Tiere weisen ein normales Wachstum und eine normale Lebenserwartung auf. Die ältesten Tiere wurden über 2 Jahre alt. Äußerlich sind sie nicht von ihren nicht-transgenen Wurfgeschwistern zu unterscheiden. Zur

Bestimmung einer eventuellen Hypertrophie wurden die Herzen gewogen. Es konnte kein Unterschied in dem Verhältnis Herzgewicht/Körpergewicht festgestellt werden. Desweiteren ist bei diesen Mäusen keine erhöhte Tumorrate festzustellen. Auch Mutationen jeglicher Art traten nicht häufiger auf als bei den nicht-transgenen Wurfgeschwistern. In der Zucht zeigten die transgenen Tiere eine normale Fertilität, Wurfgröße und Aufzuchterfolge. Hierbei machte es auch keinen Unterschied ob zwei transgene oder ein transgenes und ein Wildtyp-Tier miteinander verpaart wurden. Das Geschlecht der jeweiligen transgenen, bzw. Wildtyp-Tiere zeigte ebenfalls keinen Einfluß auf die Zuchterfolge.

Im Alter von 4-5 Wochen wurden die Tiere genotypisiert. Hierzu erfolgte eine genomische Polymerase Ketten Reaktion (PCR) unter Gebrauch des Taq PCR MasterMix Kits und spezifischen Primern für das Mäuse MLC2v und das menschliche FGF-1 als Sence- und anti-Sence Primer. Die Sequenz der Primer lautete wie folgt: MLC2v 5'-GCAGGG GCCGGCCAGCAGGCTC-3' [205] und FGF-1 5'-ACAGATCTCTTTAATCAGAAGAGA CTG-3' (freundlicherweise überlassen von Dr. I. M. Chiu, Ohio State University, Columbus, USA). Dies resultiert in einem 0,5 kb Amplifikations Produkt, das nur in den transgenen Tieren vorhanden ist.

Um sicher zu gehen, daß die Tiere das Transgen auch noch immer besitzen, wurde in unregelmäßigen Abständen durch Southern Blot Analyse der Genotyp, ersichtlich an der spezifischen 0,5 kb DNS-Fragment Bande, überprüft.

Um die Expressions-Werte des Transgens zu bestimmen, wurden Northern- (RNS) und Western-Blot (Protein) Analysen an Gewebeproben von transgenen Tieren (L1, L2 und L7) und nicht-transgenen Wurfgeschwistern im Alter von 12 bis 16 Wochen unter Benutzung von Standardmethoden durchgeführt. Die Analysen wurden zusätzlich an verschiedenen Geweben (Herz, Leber, Niere, Lunge und Teile der Oberschenkelmuskulatur) durchgeführt, um zu beweisen, daß das Transgen nur im Herzen überexprimiert wird.

Die Expression des Transgens resultierte in einer spezifischen mRNS von ca. 2,2 kb, die sich in der Länge klar von der endogenen, 4.8 kb großen, mRNS unterscheiden ließ. Die Normalisierung der Ladung wurde durchgeführt durch Rehybridisierung der Membranen mit einer Probe, die spezifisch für 18S RNS war.

Alle drei Linien (L1, L2 und L7) zeigten eine Überexpression von FGF-1 auf RNS-Ebene. Diese trat nur in den Herzen der transgenen Tiere, nicht aber in denen der Kontrolltiere auf. In den Wildtyp-Tieren hingegen wurde nur die endogene mRNS von 4,8 kb exprimiert - wenn auch nur in sehr geringen Mengen.

Die Quantifizierung der Banden ergab, daß die Tiere der Linie 1 eine 16-fache und die Tiere der Linie 7 eine 6,9-fache FGF-1 mRNS Menge besitzen. In keinem der anderen untersuchten Organe wurde eine Expression der transgenen mRNS gefunden.

In der Western-Blot-Analyse mit einem polyklonalen Antikörper gegen das humane FGF-1 des Konstrukts konnte eine Bande von 17 kDa sowohl bei den WT als auch bei den drei transgenen Linien nachgewiesen werden. In den Herzen der transgenen Tiere wurde die 1,8-fache Menge des Proteins nachgewiesen.

Aufgrund der hohen Homologie zwischen dem murinen und dem humanen FGF-1 konnte der Antikörper nicht zwischen diesen zwei Formen unterscheiden. Dies bedeutet, daß nur eine unterschiedliche Expression des Proteins FGF-1 im Vergleich zwischen transgenen und nicht-transgenen Wurfgeschwistern ermittelt werden kann, aber nicht dessen spezies-spezifische Herkunft.

Leider ist es mit diesen Techniken nicht möglich, um zwischen homozygoten und heterozygoten Tieren zu unterscheiden. Fast alle Paarungen mit zwei transgenen Elternteilen erbrachten sowohl transgene als auch nicht-transgene Jungen. Bei erneuter Anpaarung von Eltern, die zu Beginn nur transgene Jungen hatten, fielen bei den folgenden Würfen ebenfalls nicht-transgene Tiere. Nur transgene Mäuse aus Anpaarungen von Elterntieren, die bis zur Auswertung der Resultate auch nicht-transgene Junge geworfen hatten, wurden in die statistischen Analysen aufgenommen. Außerdem haben wir bei der Auswertung der Daten keine Unterschiede innerhalb der jeweiligen transgenen Linie feststellen können. Daher gehen wir davon aus, daß entweder nur heterozygot transgene Tiere in die Untersuchungen eingegangen sind, oder - zumindest für unsere Untersuchungen - kein Unterschied besteht zwischen hetero- und homozygoten Tieren.

1.2. Histologischer Phänotyp

Auf histologischer Ebene wiesen die Immunfluoreszenz-Intensitätsmessungen mit dem Konfokalen Mikroskop in den Herzen der transgenen Tiere ein signifikant erhöhtes Vorkommen von FGF-1 nach. Bei transgenen Tieren der Linie 1 war im subepikardialen Bereich eine 1,99-fache Erhöhung und im Subendokardium eine 1,34-fachen Erhöhung nachweisbar. Untersuchungen bezüglich der Lokalisation von FGF-1 zeigten, daß sowohl bei den Transgenen als auch bei den Kontrolltieren FGF-1 in den Herzmuskelzellen und in der extrazellulären Matrix vorkam. Es konnten keine Unterschiede bezüglich der Verteilung und der Lokalisation der

Immunofluoreszenz zwischen den transgenen und den nicht-transgenen Tieren gefunden werden.

Auch hier konnten die Antikörper aufgrund der Homologie des humanen und des Maus-FGF-1 nicht zwischen dem humanem und dem Mäuse-FGF-1 unterscheiden. Dennoch ändert dies nichts an der Tatsache, daß die Herzen der transgenen Tiere mehr FGF-1 bei einer vergleichbaren Lokalisation aufweisen.

Bezüglich der Anatomie des Herzens konnten keine Unterschiede in der Kammergröße, sowie der Dicke des interventrikulären Septums und der freien Wand festgestellt werden. Ebenfalls entsprach die anatomische Struktur der ventrikulären Trabekel, der Papillarmuskeln, der Herzklappen und der atrioventrikulären, sowie der interventrikulären Septen der der Kontrolltiere. Zusätzlich waren der Ursprung, die Verteilung und die Lokalisation der Koronararterien in den Transgenen und den Kontrollen vergleichbar.

Auch die elektronenmikroskopische Untersuchung der Ultrastruktur der Herzmuskelzellen und des Aufbaus der Gefäße wies keine Unterschiede zwischen den Genotypen auf. Die transgenen Tiere zeigten normale Zellkerne, ein intaktes Sarkolem, viele Mitochondrien mit eng gepackten Kristallen und Myofilamente mit typischen Z- und A-Banden. In den transgenen Tieren zeigten die kleinen Arteriolen mit einer einzigen Lage von glatten Muskelzellen eine Morphologie, die der von Kontrolltieren glich. Die Haupt-Koronararterien waren aus 5 oder 6 Lagen glatten Muskelzellen mit einem kontraktilen Phänotyp aufgebaut. Die Endothelzellen wiesen eine flache Form auf und waren von den glatten Muskelzellen durch eine durchgehende Lamina Elastica getrennt.

Bei Untersuchungen der Gefäßdichte fiel auf, daß die Anzahl der Kapillaren unverändert war. Die transgenen Herzen besaßen jedoch mehr arterielle Gefäße (L1: 1,45-fach; L7: 1,29 fach) im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. Die kleinen Arteriolen (Innendurchmesser ≤ 30 μm) waren hieran maßgeblich beteiligt. Ihre Dichte war in den transgenen Tieren 1,4-fach so hoch als in den Kontrolltieren. Die Aufzweigungen der ersten Ordnung (60-90 μm) und die Haupt-Koronararterien (≥ 90 μm) zeigten ebenfalls signifikante Unterschied bezüglich ihrer Dichte. Bei genauerer Betrachtung der Resultate zeigte sich jedoch, daß die Anzahl der Gefäße mit einem Durchmesser >60 μm sowohl in den transgenen Tieren als auch in den Wildtyp-Tieren sehr gering ist (<1/mm^2). Es kann daher davon ausgegangen werden, daß die Signifikanz nicht für eine reell vorkommende höhere Dichte spricht, sondern auf die geringe Anzahl von Gefäßen in jeder einzelnen Sektion zurückzuführen ist.

Diese erhöhte Anzahl der Arteriolen ist auf ein komplexeres arterioläres Gefäßbett im Vergleich zu Wildtyp-Tieren zurückzuführen. Die transgenen Tiere zeigten signifikant mehr Aufzweigungen der linken Haupt-Koronararterie (L1: 1,5fach und L7: 1,4fach). Außerdem wiesen kleine Arterien ähnlicher Größe eine größere Anzahl arteriolärer Abzweigungen in den transgenen Tieren als in den Wildtyp-Tieren auf.

Diese vermehrte Arteriolendichte ist darauf zurückzuführen, daß die postnatale Abnahme der arteriellen Dichte in den transgenen Tieren weniger stark ausgeprägt war als in den nicht-transgenen Tieren. In der 2. Lebenswoche war die numerische Dichte der Koronararterien in den Transgenen und den Kontrolltieren vergleichbar, während zwischen der 2. und der 36. Lebenswoche sowohl in der transgenen und als auch in der Wildtyp Gruppe die Dichte kontinuierlich abnahm. Bei den transgenen Tieren war dieser Prozeß weniger stark ausgeprägt als in den nicht-transgenen Tieren. In der 36. Lebenswoche wiesen die transgenen Tier daher 1,4-mal so viel Arterien als die Kontrolltiere auf.

Zusätzlich wiesen die transgenen Tiere eine höhere Proliferationsrate auf (1,67-fach). Die meisten proliferierenden Zellen konnten als interstitielle Zellen identifiziert werden. Die Doppelfärbung mit Ki-67 und α-Aktin wies nur eine kleine, zu vernachlässigende Anzahl von proliferierenden Zellen in den Koronar-arterien oder den Arteriolen nach.

XI. Literaturverzeichnis

1. Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, et al. Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation*. 1999;100:468-74.

2. Laham RJ, Sellke FW, Edelman ER, et al. Local perivascular delivery of basic fibroblast growth factor in patients undergoing coronary bypass surgery: results of a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Circulation*. 1999;100:1865-71.

3. Stegmann TJ, Hoppert T, Schneider A, et al. [Induction of myocardial neoangiogenesis by human growth factors. A new therapeutic approach in coronary heart disease]. *Herz*. 2000;25:589-99.

4. Helisch A, Ware JA. Therapeutic angiogenesis for ischemic heart disease. *Adv Exp Med Biol*. 2000;476:327-50.

5. Melillo G, Scoccianti M, Kovesdi I, et al. Gene therapy for collateral vessel development. *Cardiovasc Res*. 1997;35:480-9.

6. Boniece IR, Wagner JA. Growth factors protect PC12 cells against ischemia by a mechanism that is independent of PKA, PKC, and protein synthesis. *J Neurosci*. 1993;13:4220-8.

7. Zhao L, Eghbali-Webb M. Release of pro- and anti-angiogenic factors by human cardiac fibroblasts: effects on DNA synthesis and protection under hypoxia in human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1538:273-82.

8. Jin KL, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:10242-7.

9. Simons M, Bonow RO, Chronos NA, et al. Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: An expert panel summary. *Circulation*. 2000;102:E73-86.

10. Htun P, Ito WD, Hoefer IE, et al. Intramyocardial infusion of FGF-1 mimics ischemic preconditioning in pig myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30:867-77.

11. Schumacher B, Pecher P, von Specht BU, et al. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. *Circulation*. 1998;97:645-50.

12. Pecher P, Schumacher BA. Angiogenesis in ischemic human myocardium: clinical results after 3 years. *Ann Thorac Surg*. 2000;69:1414-9.

13. Cuevas P, Carceller F, Lozano RM, et al. Protection of rat myocardium by mitogenic and non-mitogenic fibroblast growth factor during post-ischemic reperfusion. *Growth Factors*. 1997;15:29-40.

14. Cuevas P, Carceller F, Martinez-Coso V, et al. Fibroblast growth factor cardioprotection against ischemia-reperfusion injury may involve K+ ATP channels. *Eur J Med Res*. 2000;5:145-9.

15. Lopez JJ, Edelman ER, Stamler A, et al. Angiogenic potential of perivascularly delivered aFGF in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *Am J Physiol*. 1998;274:H930-6.

16. Renaud F, Oliver L, Desset S, et al. Up-regulation of aFGF expression in quiescent cells is related to cell survival. *J Cell Physiol*. 1994;158:435-43.

17. Carmeliet P. VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angiomagenesis? *Nat Med*. 2000;6:1102-3.

18. Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, et al. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol*. 1995;269:H2147-54.

19. *Roche Lexikon Medizin*. 2 ed. München: Urban & Schwarzenberg; 1987.

20. Thews M, Vaupel. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. 4. Auflage ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 1991.

21. Braunwald E. Efforts to limit myocardial infarct size: Historical considerations. *Eur Heart J*. 1985;6:1-4.

22. Bussmann WD, Passek D, Seidel W, et al. Reduction of CK and CK-MB indexes of infarct size by intravenous nitroglycerin. *Circulation*. 1981;63:615-22.

23. The International Collaborative Study Group. Reduction of infarct size with the early use of timolol in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1984;310:9-15.

24. Mueller RL, Sanborn TA. The history of interventional cardiology: cardiac catheterization, angioplasty, and related interventions. *Am Heart J*. 1995;129:146-72.

25. DeWood M, Stifter W, Rudy L, et al. Bypass surgery in acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 1985;6:43-52.

26. Berger PB, Holmes DR, Jr., Ohman EM, et al. Restenosis, reocclusion and adverse cardiovascular events after successful balloon angioplasty of occluded versus nonoccluded coronary arteries. Results from the Multicenter American Research Trial With Cilazapril After Angioplasty to Prevent Transluminal Coronary Obstruction and Restenosis (MARCATOR). *J Am Coll Cardiol*. 1996;27:1-7.

27. Park JW, Braun P, Mertens S, et al. Ischemia: reperfusion injury and restenosis after coronary angioplasty. *Ann N Y Acad Sci*. 1992;669:215-36.

28. Gruppo Italiano per lo Studio della Streptochinasi nell'Infarto Miocardico (GISSI). Long-term effects of intravenous thrombolysis in acute myocardial infarction: final report of the GISSI study. *Lancet*. 1987;2:871-4.

29. Grines CL, Browne KF, Marco J, et al. A comparison of immediate angioplasty with thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. The Primary Angioplasty in Myocardial Infarction Study Group. *N Engl J Med*. 1993;328:673-9.

30. Holman BL, Chisholm RJ, Braunwald E. The prognostic implications of acute myocardial infarct scintigraphy with 99mTc-pyrophosphate. *Circulation*. 1978;57:320-6.

31. Goncalves LM. Angiogenic growth factors: potential new treatment for acute myocardial infarction? *Cardiovasc Res*. 2000;45:294-302.

32. Epstein SE, Fuchs S, Zhou YF, et al. Therapeutic interventions for enhancing collateral development by administration of growth factors: basic principles, early results and potential hazards. *Cardiovasc Res*. 2001;49:532-42.

33. Yla-Herttuala S, Martin JF. Cardiovascular gene therapy. *Lancet*. 2000;355:213-22.

34. Schaper W, Piek JJ, Munoz-Chapuli R, et al. Collateral circulation of the heart. In: Ware JA, Simons M, eds. *Angiogenesis and Cardiovascular Disease*. New York, NY, Oxford: Oxford University Press; 1999:159-198.

35. Reimer KA, Jennings RB, Tatum AH. Pathobiology of acute myocardial ischemia: metabolic, functional and ultrastructural studies. *Am J Cardiol*. 1983;52:72A-81A.

36. Jennings RB, Reimer KA, Hill ML, et al. Total ischemia in dog hearts, in vitro. 1. Comparison of high energy phosphate production, utilization, and depletion, and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs. severe ischemia in vivo. *Circ Res*. 1981;49:892-900.

37. Vogt AM, Htun P, Kluge A, et al. Insulin-like growth factor-II delays myocardial infarction in experimental coronary artery occlusion. *Cardiovasc Res*. 1997;33:469-77.

38. Trump B, Mergner W. Cell injury. In: McCluskey G, ed. *The inflammatory Process*. New York 115: Academic Press; 1974.

39. Entman ML, Michael L, Rossen RD, et al. Inflammation in the course of early myocardial ischemia. *Faseb J*. 1991;5:2529-37.

40. Folkman J, Brehm H. *Angiogenesis and inflammation*. *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*. 2 ed. New York: Raven Press; 1992.

41. Wagner J, Thiele F, Ganten D. Transgenic animals as models for human disease. *Clin Exp Hypertens*. 1995;17:593-605.

42. Costantini F, Lacy E. Introduction of a rabbit beta-globin gene into the mouse germ line. *Nature*. 1981;294:92-4.

43. Gordon JW, Ruddle FH. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science*. 1981;214:1244-6.

44. Dietrich WF, Miller J, Steen R, et al. A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature*. 1996;380:149-52.

45. Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA. Differences in reperfusion length following 30 minutes of ischemia in the rabbit influence infarct size, as measured by triphenyltetrazolium chloride staining. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:657-66.

46. Ito WD, Schaarschmidt S, Klask R, et al. Infarct size measurement by triphenyltetrazolium chloride staining versus in vivo injection of propidium iodide. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:2169-75.

47. Wolff RA, Chien GL, van Winkle DM. Propidium iodide compares favorably with histology and triphenyl tetrazolium chloride in the assessment of experimentally-induced infarct size. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32:225-32.

48. Durán A, Sans-Coma V, Arqué J, et al. Blood Supply to the Interventricular Septum of the Heart in Rodents with Intramyocardial Coronary Arteries. *Acta Zoologica (Stockholm)*. 1992;73:223-229.

49. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-41.

50. Auer J, Berent R, Eber B. [Long-term outcome after emergency coronary intervention]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2001;126:448.

51. Najarian S, Sharifzadeh H. Effects of balloon inflation on the atherosclerotic plaque. *Biomed Sci Instrum*. 2001;37:337-41.

52. Verheugt FW, Meijer A, Lagrand WK, et al. Reocclusion: the flip side of coronary thrombolysis. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27:766-73.

53. Gersh BJ. Optimal management of acute myocardial infarction at the dawn of the next millennium. *Am Heart J*. 1999;138:S188-202.

54. Schaper W, De Brabander M, Lewi P. DNA synthesis and mitoses in coronary collateral vessels of the dog. *Circ Res*. 1971;28:671-9.

55. Sabia PJ, Powers ER, Ragosta M, et al. An association between collateral blood flow and myocardial viability in patients with recent myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1992;327:1825-31.

56. Sasayama S, Fujita M. Recent insights into coronary collateral circulation. *Circulation*. 1992;85:1197-204.

57. Williams DO, Amsterdam EA, Miller RR, et al. Functional significance of coronary collateral vessels in patients with acute myocardial infarction: relation to pump performance, cardiogenic shock and survival. *Am J Cardiol*. 1976;37:345-51.

58. Hirai T, Fujita M, Nakajima H, et al. Importance of collateral circulation for prevention of left ventricular aneurysm formation in acute myocardial infarction. *Circulation*. 1989;79:791-6.

59. Shammas NW, Moss AJ, Sullebarger JT, et al. Acquired coronary angiogenesis after myocardial infarction. *Cardiology*. 1993;83:212-6.

60. Rentrop KP, Feit F, Sherman W, et al. Serial angiographic assessment of coronary artery obstruction and collateral flow in acute myocardial infarction. Report from the second Mount Sinai-New York University Reperfusion Trial. *Circulation*. 1989;80:1166-75.

61. Shen WF, Cui LQ, Gong LS, et al. Beneficial effect of residual flow to the infarct region on left ventricular volume changes after acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 1990;119:525-9.

62. Nohara R, Kambara H, Murakami T, et al. Collateral function in early acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1983;52:955-9.

63. Schwartz H, Leiboff RL, Katz RJ, et al. Arteriographic predictors of spontaneous improvement in left ventricular function after myocardial infarction. *Circulation*. 1985;71:466-72.

64. Habib GB, Heibig J, Forman SA, et al. Influence of coronary collateral vessels on myocardial infarct size in humans. Results of phase I thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) trial. The TIMI Investigators. *Circulation*. 1991;83:739-46.

65. Schaper W, Schaper J, Pasyk S. Development of a Collateral Circulation in Chronic Experimental Coronary Occlusion. In: *Coronary Angiography and Angina Pectoris Symposium of the European Society of Cardiology*. Hanover: Georg Thieme Publishers Stuttgart; 1976:325-327.

66. Schaper W, Sharma HS, Quinkler W, et al. Molecular biologic concepts of coronary anastomoses. *J Am Coll Cardiol*. 1990;15:513-8.

67. Kumar S, West D, Shahabuddin S, et al. Angiogenesis factor from human myocardial infarcts. *Lancet*. 1983;2:364-8.

68. Rivard A, Fabre JE, Silver M, et al. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation*. 1999;99:111-20.

69. Alsaddique AA. Ischemic preconditioning: the endogenous power--a review of the literature. *Angiology*. 2000;51:355-60.

70. Perrault LP, Menasche P. Preconditioning: can nature's shield be raised against surgical ischemic-reperfusion injury? *Ann Thorac Surg*. 1999;68:1988-94.

71. Carroll R, Yellon DM. Myocardial adaptation to ischaemia--the preconditioning phenomenon. *Int J Cardiol*. 1999;68:S93-101.

72. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74:1124-36.

73. Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, et al. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res*. 1990;66:1133-42.

74. Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res*. 2000;87:972-83.

75. Rubino A, Yellon DM. Ischaemic preconditioning of the vasculature: an overlooked phenomenon for protecting the heart? *Trends Pharmacol Sci*. 2000;21:225-30.

76. Ghosh S, Standen NB, Galinanes M. Preconditioning the human myocardium by simulated ischemia: studies on the early and delayed protection. *Cardiovasc Res*. 2000;45:339-50.

77. Yellon DM, Baxter GF. A "second window of protection" or delayed preconditioning phenomenon: future horizons for myocardial protection? *J Mol Cell Cardiol*. 1995;27:1023-34.

78. Duncia JV, Santella JB, 3rd, Higley CA, et al. MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorg Med Chem Lett*. 1998;8:2839-44.

79. Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, et al. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*. 1998;273:18623-32.

80. Sack S, Mohri M, Arras M, et al. Ischaemic preconditioning--time course of renewal in the pig. *Cardiovasc Res*. 1993;27:551-5.

81. Michaelson JC. The mode of development of the vascular system of the retina, with some observations on its significance for certain retinal disease. *Trans Opthalmol Soc UK, 68, 137*. 1948.

82. Granger HJ, Ziche M, Hawker JR, Jr., et al. Molecular and cellular basis of myocardial angiogenesis. *Cell Mol Biol Res*. 1994;40:81-5.

83. Moscatelli D, Presta M, Rifkin DB. Purification of a factor from human placenta that stimulates capillary endothelial cell protease production, DNA synthesis, and migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:2091-5.

84. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989;246:1306-9.

85. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest*. 1989;84:1470-8.

86. Kluge A, Zimmermann R, Munkel B, et al. Insulin-like growth factor II is an experimental stress inducible gene in a porcine model of brief coronary occlusions. *Cardiovasc Res*. 1995;29:708-16.

87. Kluge A, Zimmermann R, Weihrauch D, et al. Coordinate expression of the insulin-like growth factor system after microembolisation in porcine heart. *Cardiovasc Res*. 1997;33:324-31.

88. Banai S, Jaklitsch MT, Casscells W, et al. Effects of acidic fibroblast growth factor on normal and ischemic myocardium. *Circ Res*. 1991;69:76-85.

89. Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, et al. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation*. 1994;89:2183-9.

90. Pearlman JD, Hibberd MG, Chuang ML, et al. Magnetic resonance mapping demonstrates benefits of VEGF-induced myocardial angiogenesis. *Nat Med*. 1995;1:1085-9.

91. Unger EF, Banai S, Shou M, et al. A model to assess interventions to improve collateral blood flow: continuous administration of agents into the left coronary artery in dogs. *Cardiovasc Res*. 1993;27:785-91.

92. Yanagisawa-Miwa A, Uchida Y, Nakamura F, et al. Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science*. 1992;257:1401-3.

93. Battler A, Scheinowitz M, Bor A, et al. Intracoronary injection of basic fibroblast growth factor enhances angiogenesis in infarcted swine myocardium. *J Am Coll Cardiol*. 1993;22:2001-6.

94. Uchida Y, Yanagisawa-Miwa A, Nakamura F, et al. Angiogenic therapy of acute myocardial infarction by intrapericardial injection of basic fibroblast growth factor and heparin sulfate: an experimental study. *Am Heart J*. 1995;130:1182-8.

95. Franco WP, Bracey AW, Franco KL, et al. Fibroblastic growth factor and infarct size. *Ann Intern Med*. 1980;93:637-8.

96. Peters KG, De Vries C, Williams LT. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:8915-9.

97. Unger EF, Banai S, Shou M, et al. Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model. *Am J Physiol*. 1994;266:H1588-95.

98. Basilico C, Moscatelli D. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res*. 1992;59:115-65.

99. Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, et al. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1492:203-6.

100. Gospodarowicz D. Fibroblast growth factor. *Crit Rev Oncog*. 1989;1:1-26.

101. Zhu X, Komiya H, Chirino A, et al. Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors. *Science*. 1991;251:90-3.

102. Abraham JA, Whang JL, Tumolo A, et al. Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. *Embo J*. 1986;5:2523-8.

103. Gospodarowicz D, Bialecki H, Greenburg G. Purification of the fibroblast growth factor activity from bovine brain. *J Biol Chem*. 1978;253:3736-43.

104. Schmidt M, Sharma HS, Schott RJ, et al. Amplification and sequencing of mRNA encoding acidic fibroblast growth factor (aFGF) from porcine heart. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;180:853-9.

105. Casscells W, Speir E, Sasse J, et al. Isolation, characterization, and localization of heparin-binding growth factors in the heart. *J Clin Invest*. 1990;85:433-41.

106. Sasaki H, Hoshi H, Hong YM, et al. Purification of acidic fibroblast growth factor from bovine heart and its localization in the cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 1989;264:17606-12.

107. Spirito P, Fu YM, Yu ZX, et al. Immunohistochemical localization of basic and acidic fibroblast growth factors in the developing rat heart. *Circulation*. 1991;84:322-32.

108. Burgess WH, Maciag T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem*. 1989;58:575-606.

109. Parker TG, Packer SE, Schneider MD. Peptide growth factors can provoke "fetal" contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes. *J Clin Invest*. 1990;85:507-14.

110. Gospodarowicz D, Weseman J, Moran J. Presence in brain of a mitogenic agent promoting proliferation of myoblasts in low density culture. *Nature*. 1975;256:216-9.

111. Maciag T, Cerundolo J, Ilsley S, et al. An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: identification and partial characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76:5674-8.

112. Lemmon SK, Riley MC, Thomas KA, et al. Bovine fibroblast growth factor: comparison of brain and pituitary preparations. *J Cell Biol*. 1982;95:162-9.

113. Wang WP, Lehtoma K, Varban ML, et al. Cloning of the gene coding for human class 1 heparin-binding growth factor and its expression in fetal tissues. *Mol Cell Biol*. 1989;9:2387-95.

114. Wang WP, Quick D, Balcerzak SP, et al. Cloning and sequence analysis of the human acidic fibroblast growth factor gene and its preservation in leukemia patients. *Oncogene*. 1991;6:1521-9.

115. Madiai F, Hackshaw KV, Chiu IM. Cloning and characterization of the mouse Fgf-1 gene. *Gene*. 1996;179:231-6.

116. Esch F, Ueno N, Baird A, et al. Primary structure of bovine brain acidic fibroblast growth factor (FGF). *Biochem Biophys Res Commun*. 1985;133:554-62.

117. Parker TG, Chow KL, Schwartz RJ, et al. Differential regulation of skeletal alpha-actin transcription in cardiac muscle by two fibroblast growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:7066-70.

118. Klagsbrun M. Angiogenic factors: regulators of blood supply-side biology. FGF, endothelial cell growth factors and angiogenesis: a keystone symposium, Keystone, CO, USA, April 1-7, 1991. *New Biol*. 1991;3:745-9.

119. Cuevas P, Carceller F, Munoz-Willery I, et al. Intravenous fibroblast growth factor penetrates the blood-brain barrier and protects hippocampal neurons against ischemia-reperfusion injury. *Surg Neurol*. 1998;49:77-83; discussion 83-4.

120. Miller DL, Ortega S, Bashayan O, et al. Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Mol Cell Biol*. 2000;20:2260-8.

121. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science*. 1987;235:442-7.

122. Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture. *Cancer Res*. 1986;46:467-73.

123. Folkman J, Cotran R. Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int Rev Exp Pathol*. 1976;16:207-48.

124. Gimbrone MA, Jr., Cotran RS, Leapman SB, et al. Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst*. 1974;52:413-27.

125. Johnson DE, Williams LT. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res*. 1993;60:1-41.

126. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer*. 2000;7:165-97.

127. Middaugh CR, Mach H, Burke CJ, et al. Nature of the interaction of growth factors with suramin. *Biochemistry*. 1992;31:9016-24.

128. Alberts B, Bray D, Lewis J, et al. *The Cell*. 3 ed. New York: Garland Publishing, Inc.; 1994.

129. Arman E, Haffner-Krausz R, Chen Y, et al. Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:5082-7.

130. Arman E, Haffner-Krausz R, Gorivodsky M, et al. Fgfr2 is required for limb outgrowth and lung-branching morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:11895-9.

131. Deng CX, Wynshaw-Boris A, Shen MM, et al. Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization. *Genes Dev*. 1994;8:3045-57.

132. Xu X, Weinstein M, Li C, et al. Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development*. 1998;125:753-65.

133. Yamaguchi TP, Harpal K, Henkemeyer M, et al. fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes Dev*. 1994;8:3032-44.

134. Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, et al. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet*. 1996;12:390-7.

135. Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, et al. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell*. 1996;84:911-21.

136. Fernandez B, Buehler A, Wolfram S, et al. Transgenic myocardial overexpression of fibroblast growth factor-1 increases coronary artery density and branching. *Circ Res*. 2000;87:207-13.

137. Wehrens XH, Doevendans PA, Ophuis TJ, et al. A comparison of electrocardiographic changes during reperfusion of acute myocardial infarction by thrombolysis or percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J*. 2000;139:430-6.

138. Wehrens XH, Kirchhoff S, Doevendans PA. Mouse electrocardiography: an interval of thirty years. *Cardiovasc Res*. 2000;45:231-7.

139. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest*. 1974;54:1496-508.

140. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-5.

141. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76:4350-4.

142. Lutgens E, Daemen MJ, de Muinck ED, et al. Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes. *Cardiovasc Res*. 1999;41:586-93.

143. Palmen M, Daemen MJ, Bronsaer R, et al. Cardiac remodeling after myocardial infarction is impaired in IGF-1 deficient mice. *Cardiovasc Res*. 2001;50:516-24.

144. Nelissen-Vrancken HJ, Kuizinga MC, Daemen MJ, et al. Early captopril treatment inhibits DNA synthesis in endothelial cells and normalization of maximal coronary flow in infarcted rat hearts. *Cardiovasc Res*. 1998;40:156-64.

145. Kockx MM, Muhring J, Bortier H, et al. Biotin- or digoxigenin-conjugated nucleotides bind to matrix vesicles in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol*. 1996;148:1771-7.

146. Kockx MM, Muhring J, Knaapen MW, et al. RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am J Pathol*. 1998;152:885-8.

147. Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, et al. Apoptosis in relevant clinical situations: contribution of apoptosis in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2000;45:630-41.

148. Jaenisch R, Jahner D, Nobis P, et al. Chromosomal position and activation of retroviral genomes inserted into the germ line of mice. *Cell*. 1981;24:519-29.

149. GV-SOLAS. http://www.mh-hannover.de/institute/tierlabor/gv-solas/TRANSGEN.HTML. In; 2001.

150. Buehler A, Martire A, Strohm C, et al. Angiogenesis-independent cardioprotection in FGF-1 transgenic mice. *Cardiovasc Res*. 2002:accepted April 2002.

151. Reimer KA, Jennings RB. Effects of calcium-channel blockers on myocardial preservation during experimental acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1985;55:107B-115B.

152. James TN. Apoptosis in cardiac disease. *Am J Med*. 1999;107:606-20.

153. Bhakdi S, Greulich S, Muhly M, et al. Potent leukocidal action of Escherichia coli hemolysin mediated by permeabilization of target cell membranes. *J Exp Med*. 1989;169:737-54.

154. O'Brien MC, Bolton WE. Comparison of cell viability probes compatible with fixation and permeabilization for combined surface and intracellular staining in flow cytometry. *Cytometry*. 1995;19:243-55.

155. Cheng W, Kajstura J, Nitahara JA, et al. Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. *Exp Cell Res*. 1996;226:316-27.

156. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest*. 1996;74:86-107.

157. Cuevas P, Reimers D, Carceller F, et al. Fibroblast growth factor-1 prevents myocardial apoptosis triggered by ischemia reperfusion injury. *Eur J Med Res*. 1997;2:465-8.

158. Hirko MK, Lin PH, Gosselin C, et al. In vivo tissue distribution of fibroblast growth factor-1 after intraarterial delivery. *Asaio J*. 1995;41:M630-3.

159. Bauters C. Growth factors as a potential new treatment for ischemic heart disease. *Clin Cardiol*. 1997;20:II-52-7.

160. Bauer EP, Kuki S, Arras M, et al. Increased growth factor transcription after pulmonary artery banding. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1997;11:818-23.

161. Hughes SE. Localisation and differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal and atherosclerotic human arteries. *Cardiovasc Res*. 1996;32:557-69.

162. Sheikh F, Sontag DP, Fandrich RR, et al. Overexpression of FGF-2 increases cardiac myocyte viability after injury in isolated mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H1039-50.

163. Schumacher B, Stegmann T, Pecher P. The stimulation of neoangiogenesis in the ischemic human heart by the growth factor FGF: first clinical results. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 1998;39:783-9.

164. Sellke FW, Li J, Stamler A, et al. Angiogenesis induced by acidic fibroblast growth factor as an alternative method of revascularization for chronic myocardial ischemia. *Surgery*. 1996;120:182-8.

165. Landau C, Jacobs AK, Haudenschild CC. Intrapericardial basic fibroblast growth factor induces myocardial angiogenesis in a rabbit model of chronic ischemia. *Am Heart J*. 1995;129:924-31.

166. Lazarous DF, Scheinowitz M, Shou M, et al. Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart. *Circulation*. 1995;91:145-53.

167. Cuevas P, Garcia-Calvo M, Carceller F, et al. Correction of hypertension by normalization of endothelial levels of fibroblast growth factor and nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:11996-2001.

168. Wu HM, Yuan Y, McCarthy M, et al. Acidic and basic FGFs dilate arterioles of skeletal muscle through a NO-dependent mechanism. *Am J Physiol*. 1996;271:H1087-93.

169. Cuevas P, Carceller F, Ortega S, et al. Hypotensive activity of fibroblast growth factor. *Science*. 1991;254:1208-10.

170. Tiefenbacher CP, Chilian WM. Basic fibroblast growth factor and heparin influence coronary arteriolar tone by causing endothelium-dependent dilation. *Cardiovasc Res*. 1997;34:411-7.

171. Tiefenbacher CP, Chilian WM. Heterogeneity of coronary vasomotion. *Basic Res Cardiol*. 1998;93:446-54.

172. Zhou M, Sutliff RL, Paul RJ, et al. Fibroblast growth factor 2 control of vascular tone. *Nat Med*. 1998;4:201-7.

173. Richards AG, Simonson E, Visscher MB. Electrocardiogram and phonogram of adult and newborn mice in normal conditions and under the effect of cooling hypoxia and potassium. *Am J Physiol*. 1953;174:293-298.

174. Cromartie WJ, Craddock JG. Rheumatic-like cardiac lesions in mice. *Science*. 1966;154:285-7.

175. Bruell JH, Daroczy AF, Hellerstein HK. Strain and sex differences in serum cholesterol levels of mice. *Science*. 1962;135:1071-1072.

176. Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA. Changes in R wave amplitude: ECG differentiation between episodes of reocclusion and reperfusion associated with ST-segment elevation. *J Electrocardiol*. 1997;30:211-6.

177. David D, Naito M, Michelson E, et al. Intramyocardial conduction: a major determinant of R-wave amplitude during acute myocardial ischemia. *Circulation*. 1982;65:161-7.

178. Ferrara N, Abete P, Leosco D, et al. The hypothetical role of potassium conductance on the genesis of R-wave amplitude increase during ischemia in the isolated rat heart. *Can J Physiol Pharmacol*. 1991;69:994-1000.

179. Carbonin P, Di Gennaro M, Valle R, et al. Intracellular calcium and electrogram in ischemic isolated rat heart. *Am J Physiol*. 1980;239:H380-90.

180. Carbonin P, Di Gennaro M, Valle R. R wave increase in partial and global ischemia. *J Electrocardiol*. 1980;13:99-100.

181. Hill JL, Gettes LS. Effect of acute coronary artery occlusion on local myocardial extracellular K+ activity in swine. *Circulation*. 1980;61:768-78.

182. Wiegand V, Guggi M, Meesmann W, et al. Extracellular potassium activity changes in the canine myocardium after acute coronary occlusion and the influence of beta-blockade. *Cardiovasc Res*. 1979;13:297-302.

183. Domingues G, Fozzard HA. Influenze of extracellular K+ concentration on cable properties and excitability of sheep cardiac Purkinje fibers. *Circ Res*. 1970;26:565.

184. Johnston KM, MacLeod BA, Walker MJ. Responses to ligation of a coronary artery in conscious rats and the actions of antiarrhythmics. *Can J Physiol Pharmacol*. 1983;61:1340-53.

185. Holland RP, Brooks H. Precordial and epicardial surface potentials during myocardial ischemia in the pig - a theoretical and experimental analysis of the TQ and ST segments. *Circ Res*. 1975;37:471-480.

186. Deutsch E, Berger M, Kussmaul WG, et al. Adaptation to ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty. Clinical, hemodynamic, and metabolic features. *Circulation*. 1990;82:2044-51.

187. Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA. Progressive decrease in the ST segment elevation during ischemic preconditioning: is it related to recruitment of collateral vessels? *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28:1493-9.

188. Birincioglu M, Yang XM, Critz SD, et al. S-T segment voltage during sequential coronary occlusions is an unreliable marker of preconditioning. *Am J Physiol*. 1999;277:H2435-41.

189. Padua RR, Merle PL, Doble BW, et al. FGF-2-induced negative inotropism and cardioprotection are inhibited by chelerythrine: involvement of sarcolemmal calcium-independent protein kinase C. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30:2695-709.

190. Palmen M, Daemen MJ, Lips DJ, et al. Cardiac-specific overexpression of hFGF-1 deteriorates cardiac function and alters remodeling following chronic myocardial infarction in mice. *submitted*. 2001.

191. Harada K, Grossman W, Friedman M, et al. Basic fibroblast growth factor improves myocardial function in chronically ischemic porcine hearts. *J Clin Invest*. 1994;94:623-30.

192. Giordano FJ, Ping P, McKirnan MD, et al. Intracoronary gene transfer of fibroblast growth factor-5 increases blood flow and contractile function in an ischemic region of the heart. *Nat Med*. 1996;2:534-9.

193. Palmen M, Daemen MJAP, de Windt LJ, et al. FGF-1 improves cardiac functional recovery and enhances cell survival following ischemia and reperfusion; a FGFR-R1, PKC and tyrosine kinase dependent mechanism. *in Arbeit*. 2001.

194. Sellke FW, Wang SY, Friedman M, et al. Basic FGF enhances endothelium-dependent relaxation of the collateral-perfused coronary microcirculation. *Am J Physiol*. 1994;267:H1303-11.

195. Asahara T, Bauters C, Zheng LP, et al. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation*. 1995;92:II365-71.

196. Slavin J. Fibroblast growth factors: at the heart of angiogenesis. *Cell Biol Int*. 1995;19:431-44.

197. Davidson JM, Broadley KN. Manipulation of the wound-healing process with basic fibroblast growth factor. *Ann N Y Acad Sci*. 1991;638:306-15.

198. Neufeld G, Gospodarowicz D. Basic and acidic fibroblast growth factors interact with the same cell surface receptors. *J Biol Chem*. 1986;261:5631-7.

199. Coutts JC, Gallagher JT. Receptors for fibroblast growth factors. *Immunol Cell Biol*. 1995;73:584-9.

200. Bellot F, Crumley G, Kaplow JM, et al. Ligand-induced transphosphorylation between different FGF receptors. *Embo J*. 1991;10:2849-54.

201. Baines CP, Wang L, Cohen MV, et al. Protein tyrosine kinase is downstream of protein kinase C for ischemic preconditioning's anti-infarct effect in the rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30:383-92.

202. Strohm C, Barancik T, Bruhl ML, et al. Inhibition of the ER-kinase cascade by PD98059 and UO126 counteracts ischemic preconditioning in pig myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000;36:218-29.

203. Barancik M, Htun P, Maeno Y, et al. Differential regulation of distinct protein kinase cascades by ischemia and ischemia/reperfusion in porcine myocardium. *Circulation*. 1997;96:1397 (abstract).

204. Bogoyevitch MA. Signalling via stress-activated mitogen-activated protein kinases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 2000;45:826-42.

205. Franz WM, Breves D, Klingel K, et al. Heart-specific targeting of firefly luciferase by the myosin light chain-2 promoter and developmental regulation in transgenic mice. *Circ Res*. 1993;73:629-38.

XII. Danksagung

Als ich mich 1997 bei Herrn Professor W. Schaper um die Stelle als Doktorandin in seinem Hause bewarb, hatte ich noch keine große Ahnung was FGFs eigentlich waren. Auch Mikrochirurgie kannte ich nur vom Namen her – das sollte sich jedoch sehr schnell ändern…

Jetzt, 5 Jahre später, bin ich am Abrunden meiner Doktorarbeit und habe sehr viel dazugelernt. Nicht nur für, bzw. über die Forschung, sondern auch fürs Leben (danach). Ich möchte mich bei all denjenigen, die hierbei mitgeholfen haben herzlich bedanken. Einigen, deren Hilfe mir besonders am Herzen liegt, möchte ich gerne persönlich danken:

Zu allererst meinen beiden Doktorvätern: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Schaper und Prof. Dr. Dr. h.c. R. Leiser.

Sehr geehrter Herr Schaper, ohne Sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Durch Sie habe ich in das Leben als Wissenschaftler Einblick gewonnen. Eindrücke, die mich sicher mein ganzes Leben lang begleiten werden und mich zu einem großen Teil geformt haben. Sie haben es mir ermöglicht, meine Arbeit sowohl national als auch international vorzustellen und vor einer interessierten und manchmal auch kritischen Zuhörerschaft zu verteidigen. Sie waren es auch, der mich einen Monat nach Maastricht geschickt hat, um die nötige Operationstechnik zu erlernen. Hierdurch war es mir möglich, engere Kontakte zu Maastricht aufzubauen. Es gefällt mir hier noch immer sehr gut!

Sehr geehrter Herr Leiser, vielen Dank für Ihre spontane Bereitschaft, die Arbeit von Seiten des veterinärmedizinischen Fachbereichs der Justus-Liebig-Universität zu betreuen. Sie waren es auch, der mir Dr. Christiane Pfarrer hilfreich zur Seite gestellt hat. Ich hätte mir keine bessere Betreuerin wünschen können.

Dr. Christiane Pfarrer. Liebe Christiane, vielen Dank für die Zeit, die Du Dir genommen hast, um mich vor allem bei meinen ersten Schreibversuchen in die richtigen Bahnen zu leiten – wissenschaftliches Deutsch zu Papier zu bringen ist manchmal nicht ganz einfach... Ich werde vorallem den schönen Mittag bei Dir im Garten sicher nicht so schnell vergessen – der frischgebackene Kuchen schmeckte vorzüglich.

Der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaft e.V. möchte ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel danken. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Nun folgt ein großes Dankeschön an meine Freunde und Kollegen in Maastricht:

Prof. Dr. Dick Slaaf. Beste Dick, zonder jou was dit boekje nooit zo goed geschreven. Jij hebt altijd binnen enkele dagen de correcties aan mij gegeven en die meteen met mij besproken. Ik heb er echt van genoten – vooral als we dat bij een eetentje deden! Wil je mij niet ook eens leren zo goed te koken?

Ook al was je niet altijd vertrouwd met het onderwerp, je hebt toch altijd heel snel de zwakke punkten gevonden en die er samen met mij uitgehaald of verbeterd. Je was al de jaren een heel goede vriend en ik zal je nooit vergeten. Mischien kunnen wij zo goed met elkaar opschieten omdat wij in sommige dingen wel heel erg op elkaar lijken.

Dr. Pieter Doevendans, Dr. Xander Wehrens, Drs. Meindert Palmen und Ronald Bronsaer. Jullie allemaal bedankt voor de intensieve samenwerking in Maastricht en jullie hulp bij de verschillenden onderdelen van mijn werk. Meindert, wat denk je: Gaat het nog iets worden met de uiensoep?

Beste mensen van Farmakologie (Dr. Ben Janssen, Nicole Bitsch, Jacques Debets en Peter Leenders). Bedankt voor jullie hulp bij mijn eerste microchirurgie operaties.

Dr. Ebo de Muinck. Beste Ebo, ook al heb je niet direct iets met mijn proefschrift te maken gehad, ik wil je bedanken voor de medewerking dat ik mijn proefschrift kon afronden.

Und jetzt wieder nach Deutschland...:

Gerd Stämmler. Lieber Gerd, wenn es einen gibt, der im Umgang mit Computern erfahren ist, dann Du! Wie oft mußtest Du helfen, wenn der Computer mal wieder nicht so wollte wir wir uns das so dachten... Und das kam ziemlich häufig vor! Auch waren die Fragen noch so „dumm“, so hast Du uns doch immer mit Deiner geschätzten ruhigen Art geholfen. Unersätzlich warst Du vorallem wenn es um das Layouten von Publikationen und Dissertationen ging. Auch hattest Du manchmal andere, kostensparendere Vorstellungen, so kam man doch immer gemeinsam auf für alle Parteien zu akkzeptierende Lösungen. Vielen Dank für alles!

Dr. René Zimmermann. Lieber René, auch Dir vielen Dank für die gute Zusammenarbeit in den letzten Jahren. Ohne Deine Mäuse und Deine Unterstützung wäre es nie zu dieser Arbeit gekommen!

Dr. Bernd Winkler. Ich werde unsere kleinen liebenswürdigen Zankereien sehr vermissen!

Christoph Kraft und Sven Kilian, vielen Dank Euch beiden für das Vermitteln der Arbeit.

Liebe Susanne Martin, liebe Heike Schaffrath. Als Sekretärinnen hattet Ihr des öfteren die undankbare Aufgabe, Termine zum Durchsprechen meiner Doktorarbeit mit Herrn Prof. Schaper zu vereinbaren. Die Tatsache, daß ich mich zu diesem Zeitpunkt bereits in Maastricht aufhielt, machte es nicht unbedingt einfacher... Mit kleinen Anlaufschwierigkeiten ist es doch ganz gut geglückt – Ich habe fertig!

Lieber Herr Langsdorf, durch Ihre unermütliche Leidenschaft zu Basteln und zu Erfinden, haben Sie uns des öfteren viel Zeit und der Max-Planck-Gesellschaft viel Geld gespart. Ich erwähne beispielhaft hierfür nur den nagelneuen Millar-katheter...

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Doktoranden der Abteilung für Experimentelle Kardiologie und des Institutes für die Bereitschaft, mich zu unterstützen, und für die hervorragende Teamarbeit in freundschaftlicher Atmosphäre danken.

Liebe ehemalige Kollegen am Max-Planck-Institut. Vielen Dank vorallem denjenigen, die mir beim Durchführen der verschiedenen Versuche geholfen haben. Vorallem Alessandra Martire, Dr. Borja Fernandez, Claudia Strohm, Dr. Dimitri Scholz, Marie Luise von Brühl, Sven Kilian, Frau Prof. Schaper, Sylvia Thomas und Dr. Tibor Ziegelhöffer sei hierfür herzlich gedankt.

Sylvia Thomas und Susanne Martin. Ein Hoch auf die fleißigen Korrektoren!

Meinem Freundes- und Bekanntenkreis in Deutschland und Maastricht danke ich für die fortwährende moralische und soziale Prägung während der letzten Jahren, sowie für die vielen schönen Erinnerungen.

Juliane Halbmayr, Dir gebührt hierbei ein besonderer Dank. Wie oft habe ich mich bei Dir ausgeheult, wenn es mal wieder nicht klappte. Vorallem Deine Hilfe beim etwas überstürzten Umzug von Moelingen (Belgien) nach Maastricht und unser gemeinsamer Türkeiaufenthalt werden mir immer in Erinnerung bleiben. Wir haben hieraus denke ich beide gelernt…

Lieber Polat Ötzer, immer wenn ich dachte, daß ich Probleme habe, hast Du mich davon überzeugt, daß es Menschen gibt, denen es noch schlechter geht...

Meinen Eltern, die mit Ihrer finanziellen und mentalen Unterstützung mein Studium und meine Doktorarbeit unterstützt haben. Mutti, auch konntest Du Dich nie ganz damit abfinden, daß ich für meine Arbeit Tiere töten muß, so hoffe ich doch, daß Du Dich mit mir über meine Doktorarbeit freust. Patrick - mein Bruderherz - im nachhinein hat sich der ganze Stress doch gelohnt. Auch wenn das Gehalt nicht unbedingt Deinen Vorstellungen entsprach…

XIII. Curriculum vitae

Alexandra Bühler

12 May 1971 Born in Mannheim, Germany

Education

1981 - 1986	Hebel Gymnasium, Schwetzingen, Germany
1986 - 1991	Johann-Sebastian-Bach Gymnasium, Mannheim-Neckarau, Germany
1991 - 1997	Study of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University Gießen, Germany
1996 - 1997	Internship in Worcester, South Africa

Research

1997 - 2000	PhD-student, Max-Planck-Institute for Physiological and Clinical Research, Department Experimental Cardiology, Prof. W. Schaper, Bad Nauheim, Germany
May 1998	University of Maastricht, Faculty of Medicine, Department of Cardiology, Dr. Pieter Doevendans, Maastricht, The Netherlands
2000 - 2001	University of Maastricht, Faculty of Medicine, Department of Physiology, Prof. Dr. Dick Slaaf, Dr. Mirjam oude Egbrink, Maastricht, The Netherlands
2001 - now	Postdoctoral position, University of Maastricht, Faculty of Medicine, Department of Cardiology, Dr. Ebo Derk de Muinck, Maastricht, The Netherlands

Publications

B. Fernandez, **A. Buehler**, S. Wolfram, S. Kostin, G. Espanion, W.M. Franz, H. Niemann, P.A. Doevendans, W. Schaper, R. Zimmermann
„Transgenic myocardial overexpression of fibroblast growth factor-1 increases coronary artery density and branching."
Circulation Research, August 4, 2000;87(3):207-13

A. Buehler, A. Martire, C. Strohm, S. Wolfram, B. Fernandez, M. Palmen, X. Wehrens, P. Doevendans, W. Franz, W. Schaper, R. Zimmermann
„Angiogenesis-independent cardioprotection in FGF-1 transgenic mice."
Cardiovascular Research, September, 2002;55(4):768-777

A. Martire, B. Fernandez, **A. Buehler**, Claudia Strohm, Jutta Schaper, René Zimmermann, Pappachan E. Kolattukudy, W. Schaper
„Cardiac overexpression of MCP-1 mimics ischemic preconditioning through SAPK/JNK1/2 activation in mice."
Submitted

M. Palmen, M.J. Daemen, D.J. Lips, **A. Buehler**, C. de Theije, R.J.P. Bronsaer, R. Zimmermann, E.D. de Muinck, W.R. Dassen, M. van Eickels, M.A. Kockx, J.F. Smits, P.A. Doevendans
„Cardiac-specific overexpression of hFGF-1 deteriorates cardiac function and alters remodeling following chronic myocardial infarction in mice."
In Preparation