

Aus der Klinik für Innere Medizin III –
Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Böhm

**Untersuchungen zum Einfluss des PPARgamma-Agonisten
Rosiglitazon auf die Apoptose isolierter neonataler Kardiomyozyten
bei Hypoxie/Reoxygenierung**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2011*

Vorgelegt von:
Marc Werner

Geb. am 03.05.1981 in Esch-sur-Alzette (Luxemburg)

Meiner Familie

Abkürzungen:

ABTS	2,2'-Azino-Di(3-Ethylbenzthiazoline-Sulfonate)
AK	Antikörper
ATP	Adenosin Triphosphat
AVG	Average = Mittelwert
CPT-1	Carnitine Palmitoyltransferase
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EGTA	Ethylen Glycol Tetraacetic Acid
ELISA	Enzyme-Linked-ImmunoSorbant-Assay
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
GLUT-4	Glukose-4-Transporter
HEPES	2-(4-(2-HydroxyEthyl)- 1-PiperazinyI)-EthansulfonSäure
IGF-1	Insulin-like-Growth Factor
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KHK	Koronare Herzkrankheit
LAD	Left Anterior Descending Coronary Artery
LV	Linker Ventrikel
MAPK	Mitogen-Activated-Protein Kinase
Mio	Millionen
MMP	Matrix Metalloproteinase
mPTP	mitochondrial Permeability Transition Pore
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NCS	Neonatal Calf Serum
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PEPCK	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase
PDK-1/2	Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1/2
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PPAR γ	Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptor gamma
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PTEN	Phosphatase-and Tensin-homolog-deleted-on-chromosome-10

RNA	Ribonukleinsäure
RTK	Tyrosin-Kinase-Rezeptor
RXR	Retinoid X Rezeptor
SEM	Standard Error of the Mean = Standardfehler des Mittelwertes
SHIP-2	SH ₂ containing Inositol Phosphatase 2
Tris-Acetat	Trishydroxymethylaminomethanacetat
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-End Label

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	7
1.1. Zusammenfassung – Deutsch.....	7
1.2. Zusammenfassung - Englisch	9
2. Einleitung	11
2.1. Klinische Bedeutung von myokardialer Ischämie und Reperfusionsschaden.....	11
2.2. Signaltransduktion bei Ischämie/Reperfusion	14
2.3. Effekte von PPAR γ -Agonisten im Herzen	18
2.4. Fragestellung der vorgelegten Arbeit	23
3. Material und Methoden	24
3.1. Isolierung und Kultivierung neonataler Kardiomyozyten	24
3.1.1. Präparation der Herzen aus den neonatalen Ratten	24
3.1.2. Isolierung neonataler Kardiomyozyten	25
3.1.3. Kultivierung isolierter Kardiomyozyten	26
3.1.4. Verwendete Medien	26
3.2. In Vitro Modell der Hypoxie/Reoxygenierung isolierter Kardiomyozyten	27
3.3. Untersuchung der Genexpression	28
3.3.1. Isolierung der RNA.....	28
3.3.2. Reverse Transkription	28
3.3.3. Polymerase Kettenreaktion	29
3.3.4. Gelelektrophorese der DNA	30
3.4. Quantifizierung der Apoptose	30
3.4.1. Präparation der Zellen zur Untersuchung der Apoptose	30
3.4.2. TUNEL Färbung.....	30
3.4.2.1. Permeabilisierung der Zellmembran	31
3.4.2.2. Färbung der Einzelstrangbrüche.....	31
3.4.2.3. Auswertung	31
3.4.3. Enzym-Linked-Immunosorbant Assay.....	32
3.4.3.1. Permeabilisierung der Zellmembran	32
3.4.3.2. Enzym-Linked-Immunosorbant Assay.....	32
3.4.3.3. Auswertung	33
3.5. Immunoblot	33
3.5.1. Proteinisolierung	33
3.5.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	33
3.5.3. Proteingelelektrophorese	33
3.5.4. Proteintransfer.....	34
3.5.5. Antikörperinkubation, Entwicklung und Auswertung.....	34
3.6. Verwendete Substanzen	35
3.6.1. Substanzen für die Zellkultur.....	35
3.6.2. Substanzen für die Untersuchung der Genexpression	35
3.6.3. Substanzen für die Quantifizierung der Apoptose	35
3.6.4. Substanzen für die Untersuchung der Proteinexpression	35
3.6.5. Sonstige Substanzen	36
3.7. Statistik.....	37
4. Ergebnisse	38
4.1. Wirkung von Rosiglitazon auf die Expression des PPAR γ -regulierten Gens CPT-1 in isolierten neonatalen Kardiomyozyten.....	38

4.2.	Wirkung des PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon auf die Apoptose isolierter Kardiomyozyten bei Hypoxie/Reoxygenierung	40
4.3.	Molekulare Effekte von Rosiglitazon in Kardiomyozyten bei Hypoxie/Reoxygenierung	44
4.3.1.	Regulation der Proteinkinase Akt-abhängigen Signaltransduktion durch Rosiglitazon bei Hypoxie/Reoxygenierung	44
4.3.2.	Effekte von Rosiglitazon auf die MAP Kinasen (ERK 1/2 und JNK) bei Hypoxie/Reoxygenierung isolierter Kardiomyozyten	52
4.3.3.	Untersuchung der Regulation der Phosphatase PTEN durch Rosiglitazon bei Hypoxie/ Reoxygenierung in isolierten Kardiomyozyten.....	58
5.	Diskussion	60
5.1.	Die Erhöhung der Expression des PPAR γ -abhängigen Zielgens CPT-1 durch Rosiglitazon in Kardiomyozyten	60
5.2.	Antiapoptotische Effekte des PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon bei Hypoxie/Reoxygenierung	61
5.3.	Mechanismus des antiapoptotischen Effektes von Rosiglitazon	63
5.4.	Zusammenfassung und mögliche klinische Bedeutung.....	68
6.	Literaturverzeichnis	70
7.	Publikationen/Dank	80
7.1.	Publikationen.....	80
7.2.	Danksagungen	81
8.	Lebenslauf	82

1. Zusammenfassung

1.1. Zusammenfassung – Deutsch

Die koronare Herzkrankheit und resultierende kardiovaskuläre Ereignisse stellen eine der häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrienationen dar, insbesondere bei Patienten mit Diabetes mellitus. PPARgamma-Agonisten sind orale Antidiabetika, die die Insulinresistenz verbessern. Darüber hinaus wurden Glukose-unabhängige Effekte nachgewiesen, die verschiedene Surrogatparameter für das kardiovaskuläre Risiko günstig beeinflussen. Tierexperimentell wurde dabei unter anderem eine Reduzierung der Myokardinfarktgröße nachgewiesen. Ob dieser kardioprotektive Effekt jedoch auf eine direkte Wirkung der PPARgamma Agonisten an den Kardiomyozyten zurückzuführen ist oder systemische Effekte dafür verantwortlich sind, ist bis jetzt ungeklärt. In dieser Arbeit wurden die Effekte des PPARgamma-Agonisten Rosiglitazon an isolierten Kardiomyozyten in einem Hypoxie/Reoxygenierungs-Modell in vitro überprüft, um zu klären, ob PPARgamma-Agonisten direkte protektive Effekte an Kardiomyozyten bei Hypoxie/Reoxygenierung haben.

Es konnte zunächst gezeigt werden, dass die Expression des PPAR γ regulierten Gens CPT-1 in Kardiomyozyten nach Rosiglitazonbehandlung signifikant ($p < 0,03$) erhöht war. Der PPAR γ -Agonist Rosiglitazon reguliert also auch in Kardiomyozyten PPAR γ -abhängige Zielgene, sodass direkte Effekte auf diese Zellen möglich sind. Kardiomyozyten von neonatalen Ratten wurden einer 4-stündigen Hypoxie, gefolgt von einer 5-minütigen bis zu 12-stündigen Reoxygenierung unterzogen. Basal und nach 4h Hypoxie zeigte sich in einer immunhistochemischen Färbung (TUNEL) kein Unterschied in der Apoptose zwischen der Kontrollgruppe und den mit Rosiglitazon behandelten Zellen (Basal 12,9% vs. 11,4%; nach 4h Hypoxie 25,5% vs. 23,9% apoptotische Zellen). Nach einer der Hypoxie folgenden 12-stündigen Reoxygenierung stieg die Apoptose in den unbehandelten Zellen auf 34,1% an, während sie in den mit Rosiglitazon behandelten Zellen annähernd konstant blieb (26,4%). Die durch die Reoxygenierung induzierte Apoptose konnte somit durch Rosiglitazon komplett inhibiert werden. In einem Enzyme-Linked-ImmunoSorbant-

Assay (ELISA) in dem Histon gebundene DNA Fragmente nachgewiesen wurden, konnten die Ergebnisse bestätigt werden. Hier war nach 4h Hypoxie und 12h Reoxygenierung die Apoptose in Gegenwart von Rosiglitazon signifikant, um 35% geringer ($p < 0,05$). In den mit Rosiglitazon behandelten Kardiomyozyten war die Rephosphorylierung der Proteinkinasen Akt und GSK-3 β zu den frühen Zeitpunkten der Reoxygenierung signifikant ($p < 0,05$) verstärkt, sodass die antiapoptotische Wirkung von Rosiglitazon, zumindest partiell, auf die verstärkte Rephosphorylierung der Proteinkinasen Akt und GSK-3 β zurückzuführen ist. Die Proteinkinase Akt hat eine zentrale Bedeutung bei der Hemmung von Apoptose bei myokardialer Ischämie und Reperfusion. GSK-3 β , das im phosphorylierten Zustand inaktiviert ist, ist ein etablierter downstream gelegener Mediator der Effekte von Akt. Der Effekt von Rosiglitazon auf Akt scheint spezifisch für die Reoxygenierung zu sein, da Rosiglitazon die IGF-1-bedingte Akt-Phosphorylierung in Normoxie und nach 4h Hypoxie nicht veränderte. Der Effekt scheint PPAR γ -abhängig zu sein, da nach Zugabe des PPAR γ -Inhibitors GW 9662, die verstärkte Rephosphorylierung von Akt in den mit Rosiglitazon behandelten Zellen aufgehoben war. Die ebenfalls an der Regulation der Apoptose beteiligten MAP Kinasen ERK 1 und 2 und cJun-N-terminalen Kinase (JNK) wurden nicht durch Rosiglitazon reguliert. Die Phosphatase PTEN, die ein bekannter Negativregulator von Akt ist, wurde nicht durch Rosiglitazon bei Hypoxie/Reoxygenierung reguliert.

Rosiglitazon reduziert spezifisch die durch Reoxygenierung nach Hypoxie induzierte Apoptose in Kardiomyozyten. Dieser Effekt scheint zumindest zum Teil über eine verstärkte Phosphorylierung der Proteinkinase Akt und GSK-3 β vermittelt zu werden und spezifisch für die Reoxygenierung zu sein. Diese Ergebnisse könnten einen potenziellen klinischen Nutzen von PPAR γ -Agonisten aufzeigen, indem diese Substanzen bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II, der einen eigenständigen Risikofaktor für die Genese der koronaren Herzkrankheit darstellt, die Folgen eines Myokardinfarkts reduzieren. Ebenfalls könnten PPAR γ -Agonisten eventuell den Reperfusionsschaden bei perkutanen Koronarangioplastien oder bei Eingriffen an der Herz-Lungenmaschine reduzieren.

1.2. Zusammenfassung - Englisch

Ischemic heart disease is leading cause of death in patients with diabetes. Even after coronary recanalisation within the scope of a myocardial infarction, reperfusion injury can cause acute or chronic heart failure. PPAR gamma agonists are insulin-sensitizing drugs which provide several beneficial cardiovascular effects, i.e. by reducing blood pressure, improving dyslipidemia and decreasing markers of endothelial inflammation. In animal models PPARgamma agonists have shown to reduce the myocardial infarct size and to improve left ventricular function after 30 min of ischemia and 24 hours of reperfusion. However, little is known about the mechanism of this effect. We assessed the hypothesis, that the PPAR gamma agonist rosiglitazone has direct cardioprotective effects in ischemia / reperfusion, independent of changes in hemodynamics or inflammation.

Rosiglitazone increased the expression of the PPAR γ -dependent gene CPT-1 in isolated cardiomyocytes. To evaluate the effects of rosiglitazone during hypoxia and reoxygenation, cardiomyocytes were isolated from neonatal rats and subjected to 4 hours of hypoxia followed by reoxygenation for different times under control conditions or in the presence of the PPARgamma-agonist rosiglitazone. In normoxia and after 4 hours of hypoxia there was no difference in apoptosis, in a TUNEL-staining between controls and rosiglitazone treated cells (12,9% resp. 25.5% vs 11,4% resp. 23,9% of apoptotic cells). Additional 12 hours of reoxygenation induced an increase in apoptosis under control conditions (34.1 % apoptotic cells). Importantly, this reoxygenation induced effect was inhibited by pretreatment with rosiglitazone (26.4 % apoptotic cells). To control this effect a Cell-Death ELISA was performed after 4h of hypoxia and 12h of reoxygenation. The apoptosis in the rosiglitazone treated cells was reduced in an order of 35% (Absorption 1,10 for the control and 0,72 for the rosiglitazone treated cells). This cardioprotective effect of rosiglitazone seems, at least in part, to be mediated by activation of the protein kinase Akt, an important regulator of cardiomyocyte survival and the subsequent inhibition of GSK-3 β , which is a target of Akt. During 4 hours of hypoxia Akt was dephosphorylated in controls and rosiglitazone treated cells. However, the reoxygenation induced rephosphorylation and thereby reactivation of Akt was significantly ($p < 0.05$) pronounced in the presence of rosiglitazone in the early reoxygenation (5 and 10 min). This effect is specific for hypoxia/reoxygenation and

PPAR γ -dependent. Rosiglitazone didn't pronounce Akt phosphorylation in normoxia or hypoxia in the presence of IGF-1 (3 and 10 ng/ml), an important Akt-activator. The pronounced reoxygenation induced rephosphorylation of Akt under rosiglitazone treatment was suppressed in the presence of GW 9662, a PPAR γ -Inhibitor. GSK-3 β , a regulator of apoptosis and target of Akt, was also significantly ($p < 0,05$) phosphorylated and thereby inhibited in rosiglitazone treated cardiomyocytes in the early reoxygenation. Rosiglitazone had no effect on the regulation of the MAP-kinases ERK 1/2 and JNK. This effect of Rosiglitazone on Akt wasn't regulated by a change in PTEN expression.

In conclusion, the PPAR γ agonist rosiglitazone acts in cardiomyocytes and exerts a direct cardioprotective effect during the reoxygenation of isolated cardiomyocytes, which might, at least in part, be mediated by the activation of the protein kinase Akt and the inhibition of GSK-3 β . This effect is specific for hypoxia/reoxygenation and seems to be mediated through the PPAR γ -receptor. In the clinical setting PPAR γ -agonists could be helpful to reduce the consequences of myocardial infarction in patients suffering from diabetes mellitus type II. They could also reduce the reperfusion injury after percutaneous coronary angioplasty and after surgical interventions using a cardiopulmonary bypass.

2. Einleitung

2.1. Klinische Bedeutung von myokardialer Ischämie und Reperfusionsschaden

Kardiovaskuläre Ereignisse stellen die häufigsten Todesursachen weltweit dar. Mit einem Anteil von 50% sind Myokardinfarkte dabei führend (Cavender MA et al, 2009). Insbesondere bei Patienten mit Diabetes mellitus, der ein eigenständiger Risikofaktor für die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit (KHK) darstellt, ist die Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse erhöht (Horwich TB et al, 2010).

Fast 1 Mio Menschen erleiden jedes Jahr in Europa einen Myokardinfarkt (Becker RC et al, 2008). Dabei kommt es meist zur Plaqueruptur und anschließend zum thrombotischen Verschluss eines Koronargefäßes. Durch das auftretende Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf kommt es zu reversiblen (z.B. myocardial stunning) oder irreversiblen (Apoptose, Nekrose) Schäden am Myokard. In Abhängigkeit von der Lokalisation und Ausprägung des Schadens kann es im Verlauf zu einem myokardialen Remodeling im nicht-infarzierten Myokard kommen. Dies bedeutet, dass es durch erhöhte Druckbelastung des nicht-infarzierten Myokards und durch eine neuroendokrine Aktivierung zu zellulären Umbauvorgängen (zelluläre Hypertrophie, Apoptose, Nekrose; vermehrte Kollagenbildung und Fibroblastenproliferation) und zur linksventrikulären Dilatation mit konsekutiver Wandausdünnung kommt. Daraus resultiert eine Einschränkung der linksventrikulären systolischen myokardialen Funktion die sich schließlich in einer manifesten Herzinsuffizienz äußert (Cohn JN et al, 2000). Die Prognose der Herzinsuffizienz ist dabei mit einer Letalität von bis zu 40% pro Jahr im fortgeschrittenen Stadium ungünstig und mit der malignen Tumorerkrankungen vergleichbar (Dickstein K et al, 2008).

Die leitliniengerechte Akutversorgung eines transmuralen Myokardinfarktes ist die schnellstmögliche Wiedereröffnung des verschlossenen Koronargefäßes mittels Angioplastie und Stentimplantation oder, falls nicht zeitnah verfügbar, durch eine Lysetherapie (Van de Werf F et al, 2008). Die Rekanalisation des Infarktgefäßes

stellt die Perfusion und damit die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der nachgeschalteten Stromgebiete wieder her und beendet damit die Ischämiezeit.

Durch die Reperfusion des ischämischen Gewebes werden jedoch auch ungünstige Effekte hervorgerufen. Dieser als Reperfusionsschaden beschriebene Effekt wird entscheidend durch den Einstrom von freien Sauerstoffradikalen, die während der Ischämie gebildet werden und akkumulieren, ausgelöst (Levitsky S, 2006). Die freien Sauerstoffradikale wie z.B. Superoxid, Wasserstoffperoxid oder Hydroxyl-Radikale schädigen über direkte und indirekte Mechanismen die Zellmembranen, und dabei geht das osmotische und ionische Gleichgewicht der Zelle verloren (Bolli R et al, 1989). Dieses führt zum Zellödem, zur Nekrose, zur Apoptose, zur kontraktile Dysfunktion und zu kardialen Arrhythmien (Ferdinandy P et al, 2008). Sauerstoffradikale führen auch zur Chemotaxis und die einwandernden und aktivierten Granulozyten führen durch Zytokinausschüttung und Ausbildung von Adhäsionsmolekülen zu einer weiteren Radikalausschüttung (Moens et al, 2005). Über diesen Mechanismus unterhält sich dieser Vorgang selbst. Dabei kommt es auch zur thrombozytären Aktivierung und zur endothelialen Dysfunktion (Feldmann LJ et al, 2000).

Der Reperfusionsschaden ist jedoch nicht ausschließlich durch eine Zellschädigung durch Sauerstoffradikale bedingt. In den ersten Minuten der Reperfusion kommt es zur Kontraktur der Kardiomyozyten. Diese wird durch eine Störung der intrazellulären Kalziumregulation verursacht. Anfänglich kommt es während der Ischämie zur ATP-Verarmung. Dadurch fällt die ATP-abhängige Natrium/Kalium ATPase aus und Natrium akkumuliert in den Kardiomyozyten. Die Natriumüberladung führt über den Natrium/Kalzium-Antiporter zu einem erhöhten Austausch von Natrium gegen Kalzium, das dann in den Kardiomyozyten bis hin zu toxischen Spiegeln akkumuliert. Diese Kalziumüberladung führt bei einer schnellen Retablierung der ATP-Reserven durch die Reperfusion zu einer unkontrollierten Aktivierung der Myofibrillen. Darüber hinaus kann es Kalzium-unabhängig, bei sehr langsamer ATP-Reetablierung zur Rigor-Kontraktur kommen, bei der das Myosin am Aktin fixiert bleibt (Piper HM et al, 2003).

Ischämische und reperfusionsbedingte Schäden kommen allerdings nicht nur bei Myokardinfarkten sondern auch bei herzchirurgischen Interventionen an der Herz-Lungenmaschine vor. Über die Herz-Lungenmaschine werden das Herz und die Lungen von der Blutzirkulation ausgeschlossen und unterliegen somit einer globalen Ischämie. Der myokardiale Stoffwechsel wird durch die selektive oder unselektive intrakoronare Applikation kardiopleger Lösung und durch Kühlung reduziert. Diese Maßnahmen können jedoch ischämie- oder reperfusionsbedingte Schäden nicht vollständig verhindern. So sind bereits seit Jahren die sogenannten „stone-hearts“ bekannt, die durch die ischämie-reperfusionsbedingte Kontraktur am Ende der chirurgischen Intervention auftreten können und ein, trotz regelrechter Kardioprotektion und regelrechtem Operationsverlauf, nicht kontrahiertes, rigides Myokard darstellen (Klouché K et al, 2002). Die Zusammensetzung der kardioplegen Lösung unterliegt einer ständigen Weiterentwicklung, um diese operationsbedingten Myokardschäden und die linksventrikuläre Dysfunktion zu reduzieren (Tsukube T et al, 1994). Nicht nur unmittelbar nach der Intervention ist dies von Bedeutung, sondern auch auf längere Sicht. So konnten Steuer J et al. (2005) zeigen, dass ein perioperativer Myokardschaden durch eine koronare Bypass-Operation die Herzinsuffizienzinzidenz und Sterblichkeitsrate signifikant erhöht. Von den 7493 Patienten, die eine koronare Bypass-OP erhalten haben und über 9 Jahre beobachtet wurden, mussten 576 wegen einer manifesten Herzinsuffizienz wieder hospitalisiert werden. 20% davon erlitten nachweislich einen perioperativen Myokardschaden.

Mechanismen, die zu einer Reduktion des ischämischen Zelltodes bzw. des Reperfusionsschadens im Myokard führen sind somit von großer klinischer Bedeutung.

2.2. Signaltransduktion bei Ischämie/Reperfusion

Der Reperfusionsschaden wird auf kardiomyozytärer Ebene über die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege reguliert. Eine zentrale Bedeutung haben dabei die Mitogen-Activated-Protein Kinasen (MAPK) mit den Untereinheiten c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und Extracellular-Signal Regulated Kinase (ERK), sowie die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) abhängige Proteinkinase Akt.

Während bei den MAP-Kinasen die genauen Regulationsmechanismen von JNK bei Ischämie/Reoxygenierung noch nicht endgültig geklärt sind, konnte für die MAPK ERK 1/2 die antiapoptotische Wirkung in Kardiomyozyten bei Ischämie/Reperfusion eindeutig nachgewiesen werden.

Es gibt Hinweise, dass JNK sowohl pro- als auch antiapoptotische Effekte im Myokard bei Ischämie/Reperfusion haben kann. Kaiser RA et al (2005) konnten zeigen, dass sowohl eine Inaktivierung, als auch eine fortgesetzte Aktivierung von JNK in vivo die ischämie-/reoxygenierungsbedingte Apoptose in Kardiomyozyten reduzieren kann, vermutlich über unterschiedliche und im Detail noch nicht bekannte Mechanismen. Shao Z et al (2006) zeigten, dass in vivo und in vitro unter Hypoxie JNK eine Reaktivierung der Proteinkinase Akt bedingt und über diesen Mechanismus antiapoptotisch wirkt. Die Effekte von JNK sind dabei vermutlich abhängig vom jeweiligen Apoptose-induzierenden Stimulus und den exakten experimentellen Bedingungen.

Die MAPK ERK ist aktiviert, wenn die Phosphorylierungsstellen Threonin 202 / Tyrosin 204, respektiv Threonin185/Tyrosin187 phosphoryliert sind. Es konnte gezeigt werden, dass ERK unter Ischämie dephosphoryliert, also deaktiviert und durch die Reperfusion wieder rephosphoryliert, also reaktiviert wird (Hausenloy DJ et al, 2004). Dieser Vorgang wird als einer der wichtigsten protektiven Mechanismen bei Ischämie/Reperfusionsschäden in Kardiomyozyten angesehen (Hausenloy DJ et al, 2007). Die antiapoptotische Wirkung der MAPK-ERK 1/2 ist zum Teil durch die Inhibierung der mitochondrialen Permeabilität, via Inhibierung der mPTP (mitochondrial Permeability Transition Pore), bedingt. Dadurch wird ein mitochondriales Ödem, welches schließlich zum Zelltod führen könnte, verhindert (Honda HM et al, 2006).

Analog zur MAPK ERK stellt die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase-abhängigen (PI3K) Proteinkinase Akt einen wichtigen antiapoptotischen Mechanismus in Kardiomyozyten bei Hypoxie/Reoxygenierung dar. Matsui T et al. (1999) konnten zeigen, dass der adenovirale Transfer einer konstitutionel aktivierten PI3K und Proteinkinase Akt in vitro die Apoptose hypoxischer Kardiomyozyten inhibierte.

Die Proteinkinase Akt wurde zuerst als retrovirales Oncogen entdeckt und häufig auch als Proteinkinase B bezeichnet (Bellacosa A et al, 1991). Akt wird durch die PI3K aktiviert, die durch Agonisten an den Rezeptor-Tyrosinkinasen stimuliert werden kann. Die Aktivierung der PI3K führt zur Phosphorylierung der D3 Bindungsstelle des membranständigen Phosphatidylinositol-4,5-Biphosphats (PI4,5,P2). Das entstehende Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PI3,4,5,P3) wird über eine Inositol Phosphatase in Phosphatidylinositol-3,4-Biphosphat (PI3,4,P2) umgewandelt. PI3,4,5,P3 und PI3,4,P2 akkumulieren in der Zellmembran und rekrutieren Akt und die Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 (PDK-1) indem deren jeweilige Pleckstrin-homologe-Domäne gebunden werden (Hori H et al, 2002). An der Zellmembran phosphoryliert PDK-1 die Threonin 308 Phosphorylierungsstelle von Akt (Matsui T et al, 2003). Wenn nachfolgend durch Autophosphorylierung, bzw. durch Phosphorylierung durch eine bisher nicht eindeutig identifizierte und als PDK-2 bezeichnete Kinase, die Serin 473-Phosphorylierungsstelle von Akt phosphoryliert wird, ist Akt vollständig aktiviert. Phosphatase-and Tensin-homolog-deleted-on-chromosome-10 (PTEN) inhibiert die Aktivierung von Akt durch Rückwandlung von PI3,4,5,P3 und PI3,4,P2 zu PI4,5,P2 (Matsui T et al. 2005). Die membranständige Serin/Threonin-Phosphatase Protein Phosphatase 2A (PP2A) kann Akt dephosphorylieren und damit deaktivieren, während die SH₂ containing Inositol Phosphatase 2 (SHIP-2) PI3,4,5,P3 zu PI3,4,P2 hydrolysiert und so die downstream davon gelegenen Kinasen hemmt (Wada T et al, 2001). (Abb. 2.1.)

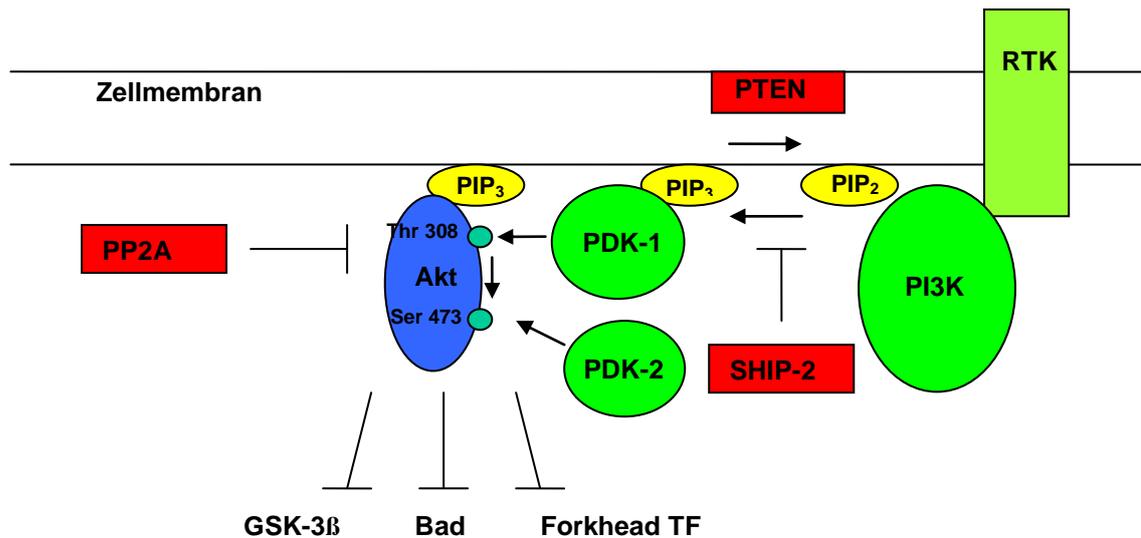


Abb. 2.1.: Schematische Darstellung der Aktivierung der Proteinkinase Akt über die Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) und die PI3-Kinase. Die Proteinkinase Akt reguliert die downstream gelegenen Kinasen GSK-3 β und Bad, sowie die Transkriptionsfaktoren Forkhead. Details siehe Text.

Die Proteinkinase Akt reguliert u.a. die Glykogen-Synthase 3 Kinase β (GSK-3 β), Bad aus der Bcl-2 Proteinfamilie und die Forkhead Transkriptionsfaktoren.

Im Gegensatz zu den meisten Proteinkinasen ist GSK-3 β im unstimulierten Zustand aktiv und wird durch Phosphorylierung an der Serin 9-Phosphorylierungsstelle durch Akt inaktiviert. Die Phosphorylierung, d.h. Inaktivierung, von GSK-3 β vermittelt günstige Effekte im hypoxischen und reperfundierten Myokard. Barillas R et al (2007) konnten zeigen, dass die Inhibierung von GSK-3 β im hypertrophierten Myokard zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Ischämien führt. Dies äußerte sich in einer verbesserten kontraktilen Funktion.

Genau wie GSK-3 β wirkt auch Bad über eine Zunahme der Permeabilität der äußeren mitochondrialen Membran apoptotisch, indem z.B. Cytochrom c aus dem Intermembranraum diffundiert (Datta SR et al, 1997). Akt kann über eine Phosphorylierung von Bad an der Serin 136 Phosphorylierungsstelle Bad inaktivieren. Die Forkhead Transkriptionsfaktoren führen zu einer vermehrten Expression proapoptotisch wirkender Proteine, wie FasL, Bim oder p27. Die Akt bedingte

Phosphorylierung der Forkhead Transkriptionsfaktoren führt zu deren Sequestration und Degradation im Zytoplasma und dies stellt einen Mechanismus dar, über den Akt die Apoptose inhibieren kann (Tang ED et al, 1999).

Die Aktivierung der Proteinkinase Akt in Kardiomyozyten bei Hypoxie/Reoxygenierung ist also ein entscheidender Mechanismus, um die Apoptose und damit den Reperfusionsschaden zu reduzieren oder zu inhibieren. Es ist jedoch bisher weitgehend unbekannt ob und ggf. durch welche Substanzen die Proteinkinase Akt im Myokard gezielt reguliert werden kann. Es gibt Hinweise, dass Agonisten am Peroxysome-Proliferator-Activated Rezeptor γ hier von Bedeutung sein könnten.

2.3. Effekte von PPAR γ -Agonisten im Herzen

Der Peroxysome-Proliferator-Activated-Receptor (PPAR) wurde erstmals in Hepatozyten von Nagetieren beschrieben, als Protein, über das verschiedene Substanzen (Fibrate, Herbizide, Weichmacher) zu einer Hepatomegalie mit einer abnormen Proliferation der Peroxisomen führten (Keller H et al, 1993).

PPAR-Rezeptoren sind nukleäre Rezeptoren der Klasse II. Es handelt sich hierbei um Transkriptionsfaktoren, die Gene regulieren, deren Genprodukte am Glukose- und Lipidstoffwechsel beteiligt sind (Latruffe N et al, 1997). Nukleäre Rezeptoren der Klasse II befinden sich auch im inaktivierten Zustand im Nukleus. Nach Bindung eines Liganden wird der PPAR-Rezeptor aktiviert und bildet ein Heterodimer mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR), der ebenfalls ein nukleärer Rezeptor der Klasse II ist (Desvergnés B et al, 1997). Endogene Liganden der PPAR-Rezeptoren sind ungesättigte Fettsäuren, Leukotriene, Isoprostane und viele andere Produkte des Fettsäurestoffwechsels.

Wenn der PPAR- bzw. der Retinoid X Rezeptor den jeweiligen Liganden bindet, werden Korepressoren abgespalten und Kofaktoren gebunden. Dadurch kommt es zur Konformationsänderung und der PPAR-Rezeptor bildet mit dem Retinoid X Rezeptor ein Heterodimer, das nun die DNA binden kann (Fenske D et al, 2003). Mit der DNA-Bindungsdomäne des PPAR-Rezeptors, bestehend aus 2 Zink-Finger-Motiven, wird das Bindungsmotiv des Promotors des Zielgens gebunden. Dieses Bindungsmotiv wird als PPRE (PPAR-response-element) bezeichnet (Nolte RT et al, 1997). Durch diese Bindung kommt es zur Acetylierung der Histone der DNA und das entsprechende Gen kann transkribiert werden. Welche Gene reguliert werden hängt im Wesentlichen davon ab, welche Liganden an die PPAR-Rezeptoren und den Retinoid X Rezeptoren binden, da die Liganden unterschiedliche Kofaktoren rekrutieren (Fenske D et al, 2003). (Abb. 2.2.)

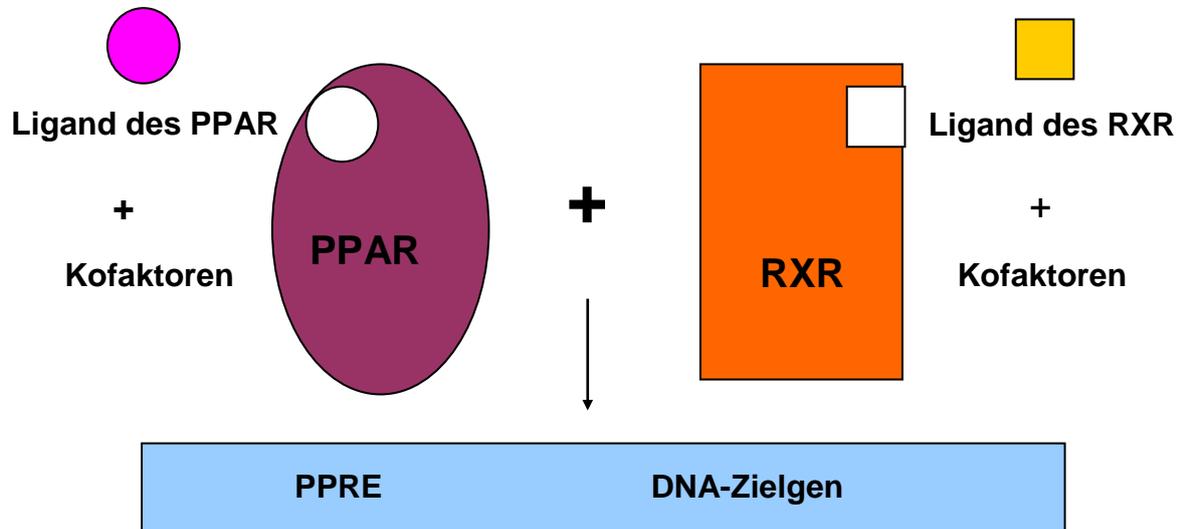


Abb. 2.2. Schematische Darstellung der Aktivierung des PPAR. Nach Bindung entsprechender Liganden und Kofaktoren durch PPAR und RXR kommt es zur Konformationsänderung und Bildung eines PPAR/RXR-Heterodimers. Das gebildete Heterodimer bindet das Peroxisome Proliferator Response Element (PPRE) des entsprechenden Zielgens, das nachfolgend transkribiert werden kann.

Es gibt 3 Subtypen des PPAR-Rezeptors: PPAR α , PPAR β und PPAR γ .

PPAR α -Rezeptoren werden vor allem in der Leber, im Herz, in der Skelettmuskulatur und in der Niere exprimiert. Sie spielen insbesondere bei der β -Oxidation der Fettsäuren und beim Metabolismus von Lipoproteinen eine wichtige Rolle. Fibrate sind schwache PPAR α -Agonisten, die zur Therapie von Fettstoffwechselstörungen eingesetzt werden können (Bighetti EJ et al, 2009). Kürzlich konnten Linz W et al (2009) sogar zeigen, dass der PPAR α -Agonist AVE8134 der postmyokardialen Hypertrophie, Fibrose und einer kardialen Dysfunktion in Ratten bei permanenter Ligatur der links-anterioren Koronararterie vorbeugt.

PPAR β -Rezeptoren werden ubiquitär exprimiert. Die natürlichen Liganden sind ungesättigte Fettsäuren. Für PPAR β -Agonisten konnte gezeigt werden, dass diese in der Skelettmuskulatur, ähnlich wie beim Ausdauertraining, zu einer Vermehrung der oxidativen Myofibrillen führen (Narkar VA et al, 2008). Lim HJ et al (2008) konnte zeigen, dass der PPAR β -Ligand L-165041, die Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen inhibiert und so eventuell arterielle Restenosen oder die Atherosklerose inhibieren oder minimieren kann. Weiterhin scheint der PPAR β -Agonist L-165041 eine wichtige Rolle bei der Wundheilung zu spielen. Liang P et al (2008) konnten zeigen, dass L-165041 PPAR β -abhängig die protektiven Effekte des epidermalen Wachstumsfaktors erhöht und die Apoptose der Keratinozyten reduziert.

PPAR γ -Rezeptoren werden hauptsächlich im Fettgewebe exprimiert, wo sie im Glukosemetabolismus und bei der Differenzierung der Adipozyten eine wichtige Rolle einnehmen. PPAR γ -Rezeptoren werden aber auch in der Leber, in der Skelettmuskulatur und im Herzmuskelgewebe exprimiert, wenn auch in 10- bis 100fach geringerer Menge (Fajas L et al, 2001). Unter den unterschiedlichen Isoformen des PPAR γ -Rezeptors (PPAR γ 1, γ 2, γ 3) wird vor allem PPAR γ 1 im Myokard exprimiert, während PPAR γ 2 ausschließlich im Fettgewebe und PPAR γ 3 im Fettgewebe und im Darm exprimiert wird (Fenske D et al, 2003). Zielgene des PPAR γ -Rezeptors sind unter vielen anderen GLUT-4, CPT-1 und PEPCK (Fenske D et al, 2003). Durch eine Aktivierung des Glukose-4-Transporter (GLUT-4), der ein membranständiges Protein ist, wird die Glukoseaufnahme in die Zelle um das 3-4fache gesteigert (Klinke R et al, 2005). Die Carnitine Palmitoyltransferase-1 (CPT-1) ist ein mitochondriales Enzym, das in der externen mitochondrialen Membran sitzt. CPT-1 vermittelt den Transport von langen Fettsäuren durch die mitochondriale Membran (Diéguez C et al, 2009). Sowohl GLUT-4, als auch CPT-1 werden kardiomyozytär exprimiert. Die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK) wird in der Leber, Niere und im Fettgewebe exprimiert und katalysiert den geschwindigkeitslimitierenden Schritt der Gluko- und Glyceroneogenese (Tontonoz P et al, 1995). Weitere PPAR γ Zielstrukturen sind die Lipoxygenase-2, die UDP-glucuronosyltransferase und die Lipoproteinlipasen.

Synthetische PPAR γ -Agonisten sind das Rosiglitazon und das Pioglitazon, die unter den jeweiligen Handelsnamen Avandia® und Actos® vermarktet werden und durch ihre insulinsensibilisierende Wirkung zur oralen Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt werden.

Wie oben beschrieben, wird die Funktion des PPAR-Rezeptors durch den gebundenen Liganden entscheidend beeinflusst. Für synthetische PPAR γ -Agonisten, wie die Thiazolidindione konnten neben der insulinsensibilisierenden Wirkung auch kardiovaskuläre Effekte gezeigt werden.

PPAR γ -Agonisten haben z.B. antihypertensive Effekte. Es konnte gezeigt werden, dass unter einer Kombinationstherapie Metformin/Rosiglitazon oder Sulfonylharnstoffe/Rosiglitazon der systolische Blutdruck stärker reduziert wurde, als unter der Kombination Metformin/Sulfonylharnstoffe (Komajda M et al, 2008).

Haffner SM et al (2002) konnten zeigen, dass bei Typ 2 Diabetikern inflammatorische Marker, wie CRP oder die Matrix Metalloproteinase (MMP-9) im Serum, unter Rosiglitazontherapie signifikant reduziert waren. Gensch C et al (2006) zeigten, dass Pioglitazon die Apoptose von endothelialen Progenitorzellen hemmt und die Neoangiogenese fördert. Auch das antiatherogen wirkende Adiponektin ist unter Pioglitazonbehandlung erhöht, wie in einer Studie von Barac A et al (2008) gezeigt.

Es sind auch direkte Effekte von PPAR γ -Agonisten auf Kardiomyozyten nachgewiesen. In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Thiazolidindione die myokardiale Hypertrophie beeinflussen können. Die Bedeutung ist allerdings noch nicht geklärt, da sowohl pro-hypertrophe, als auch antihypertrophe Effekte berichtet werden. Duan SZ et al (2005) konnten zeigen, dass ein PPAR γ -knock out in Mäusen zu einer mit dem Alter zunehmenden kardialen Hypertrophie führt. Andererseits induzierte eine Rosiglitazonbehandlung (10mg/kgKG/d) für 4 Wochen bei der Kontrollgruppe und bei den PPAR γ -knock out-Mäusen, wenn auch in geringerem Ausmaß, ebenfalls eine ventrikuläre Hypertrophie. Hier könnten pleiotrope, also PPAR γ -unabhängige Effekte von Bedeutung sein. Bao Y et al (2008) zeigten, dass eine Behandlung mit Rosiglitazon oder eine PPAR γ -Überexpression in isolierten Kardiomyozyten die Endothelin-1-induzierte Stimulation der

Proteinsynthese inhibiert und somit unter diesen Bedingungen antihypertrophe Effekte hat.

In mehreren in-vivo Tiermodellen konnten günstige Effekte bei Myokardinfarkt durch synthetische PPAR γ -Agonisten nachgewiesen werden. Yue TI TL et al (2001) konnten zeigen, dass Rosiglitazon die Myokardinfarktgröße reduziert sowie die kontraktile Dysfunktion verbessert. Bei männlichen Lewis Ratten, wurde die LAD (Left anterior descending coronary artery) für 30 Minuten ligiert und anschließend für 24 Stunden reperfundiert. Unter 1 bzw. 3 mg/kg Rosiglitazon i.v. war das Infarktareal um 30% bzw. um 37% kleiner im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch eine orale Vorbehandlung über eine Woche (3 mg/kg/d p.o.) reduzierte die Infarktgröße um 24%. Unter Rosiglitazon waren 40% bzw. 43% weniger neutrophile Leukozyten und Makrophagen im Infarktareal nachweisbar, sodass hier die Reduktion der Infarktgröße auf eine verringerte inflammatorische Antwort zurückgeführt wurde. In einem ähnlichen Tiermodell konnten Cao Z et al (2007) zeigen, dass durch Pioglitazon, einem anderen synthetischen PPAR γ -Agonisten, der Anteil der Nekrose am ischämischen Myokard um 28% und der Anteil der Nekrose an der linksventrikulären Masse um 32% geringer war. Die diastolische und v.a. die systolische linksventrikuläre Funktion waren signifikant besser in der mit Pioglitazon behandelten Gruppe als in der Kontrollgruppe. Neben einer Reduktion der Nekrose, war die Expression der Matrix Metalloproteinase 2 (MMP-2), auf Protein- und mRNA-Ebene reduziert. Die MMP-2 ist ein prädiktiver Marker einer Herzinsuffizienz nach einem Myokardinfarkt (Wagner DR et al, 2006).

Es konnte also gezeigt werden, dass PPAR γ -Agonisten auch direkt auf Kardiomyozyten wirken. Unklar ist jedoch ob die protektiven Effekte von PPAR γ -Agonisten bei Ischämie/Reperfusion durch eine direkte Wirkung auf die Kardiomyozyten und eine Regulation der kardiomyozytären Signaltransduktion mitverursacht sein könnten oder ob es sich hierbei um systemische Effekte handelt

2.4. Fragestellung der vorgelegten Arbeit

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der PPAR γ -Agonist Rosiglitazon direkte Effekte auf isolierte Kardiomyozyten bei Hypoxie/Reoxygenierung hat und über welchen Mechanismus diese ggf. vermittelt werden. Dabei sollten im Einzelnen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Induziert der PPAR γ -Agonist Rosiglitazon eine Aktivierung von PPAR γ regulierten Genen in Kardiomyozyten und sind somit Kardiomyozyten direkte Zielzellen von PPAR γ -Agonisten?

Anhand der reversen Transkription und der Polymerase Ketten Reaktion (PCR) wurde untersucht, ob die mRNA des PPAR γ -regulierten Gens CPT-1 durch Rosiglitazon in Kardiomyozyten reguliert wird.

2. Beeinflusst der PPAR γ -Agonist Rosiglitazon den Zelltod isolierter Kardiomyozyten bei Hypoxie/Reoxygenierung?

Die Apoptose in isolierten Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten wurde nach 4h Hypoxie und 12h Reoxygenierung mittels Enzyme-Linked-ImmunoSorbant-Assay (ELISA) und Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-End Label-Staining (TUNEL-Färbung) bestimmt.

3. Über welche Signaltransduktionsmechanismen werden eventuelle Effekte vermittelt?

Hierbei wurde mittels Immunoblot unter Verwendung phosphospezifischer Antikörper, die Aktivierung von Signaltransduktionswegen, die für die Apoptose bzw. die Protektion des Myokards bei Ischämie/Reperfusion von Bedeutung sind, untersucht.

3. Material und Methoden

3.1. Isolierung und Kultivierung neonataler Kardiomyozyten aus Ratten

Die neonatalen Kardiomyozyten wurden aus Sprague-Dawley-Ratten, die 2 bis 4 Tage alt waren, isoliert. Jeder Wurf zählte zwischen 8 und 16 Tieren. Die Präparation wurde unter einer sterilen Werkbank (Herasafe) durchgeführt. Die isolierten Kardiomyozyten wurden in Zellkulturschalen (Durchmesser 6 cm) in einem Brutschrank (HeraCell 150) bei 37 °C in einer mit Wasserdampf und 5% CO₂ gesättigten Atmosphäre kultiviert. Um die Zellen funktionell zu beurteilen und eine bakterielle Kontamination auszuschließen, wurden die Zellen nach 2 Tagen im Brutschrank unter dem Lichtmikroskop (CK2, Olympus) kontrolliert.

3.1.1. Präparation der Herzen aus den neonatalen Ratten

Der Kopf der Ratten wurde mit einer sterilen Präparierschere entfernt, die offene Wundfläche 1 Sekunde in 70% Ethanol getaucht und der Thorax dann mit einer sterilen Präparierschere mittels eines parasternalen Schnittes eröffnet.

Durch einen leichten Daumendruck auf das Abdomen trat das Herz hervor, das durch einen dorsokraniellen Schnitt mit der kleinen Präparierschere entnommen wurde und in eine Gewebekulturschale (Durchmesser 10 cm) mit 10 ml eisgekühlter Lösung (ADS-Puffer) gegeben wurde.

Von den isolierten Herzen wurde das Bindegewebe, die Gefäße und die Vorhöfe entfernt. Die Ventrikel wurden, nachdem sie in eine neue Gewebekulturschale gegeben wurden, mit einem Cutter in möglichst kleine Gewebsstücke geschnitten.

3.1.2. Isolierung neonataler Kardiomyozyten

Der abgesaugte ADS-Puffer wurde durch 10 ml Enzymlösung (Pankreatin 0,6 mg/ml und Collagenase Typ 2 0,5 mg/ml) ersetzt, diese dann mit den Gewebestücken in eine sterile Glasflasche mit 5 cm Bodendurchmesser gegeben.

Das Gewebe wurde für 5 min bei 37 °C bei 80-100 U/min im Wärme-Schüttelbad inkubiert und der Überstand nach Zentrifugation (5 min bei 700 U/min) verworfen. Dann wurden wieder 10 ml Enzymlösung hinzugegeben.

Um die Kardiomyozyten aus dem Zellverband zu lösen wurden 5 verschiedene Inkubationszeiten (20, 2x25, 15 und 10 min) bei 37°C bei 80-100 U/min im Wärme-Schüttelbad gewählt. Der Überstand wurde jeweils in ein 50 ml Falcon abpipettiert, mit 2 ml NCS (Neonatal Calf Serum) neutralisiert um den Enzymverdau zu beenden und mit 700 U/min 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dann wurde der Überstand verworfen, das Pellet durch Zugabe von 4 ml NCS resuspendiert und im Brutschrank inkubiert. Dabei wurde der Deckel des Falcongefäßes nur leicht angeschraubt um eine Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten.

Anschließend wurden alle Zellsuspensionen in einem Falcon gesammelt und mit 700 U/min für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 4 ml Wachstumsmedium durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert. Diese Zelllösung wurde anschließend durch einen Falcon-Cell-Stainer mit 70 µm Maschenweite filtriert und in ein neues Falcongefäß gegeben. Vor und nach dem Filtrieren wurde der Cell Stainer mit jeweils 1 ml Medium angefeuchtet, bzw. gespült.

Um die verbliebenen Fibroblasten weitgehend zu eliminieren wurde die Zellsuspension für 1 Stunde im Brutschrank in einer Zellkulturschale (Durchmesser 6 cm) inkubiert. Dabei adhären die Fibroblasten am Schalenboden, während die Kardiomyozyten in Suspension verbleiben. Die Suspension wurde dann in ein Falcongefäß gegeben.

3.1.3. Kultivierung isolierter Kardiomyozyten

Mittels einer Neubauer-Kammer erfolgte die Zellzählung. 10 µl Zellsuspension und 10 µl Trypanblau wurden in eine Neubauer-Kammer gegeben, 4 große Quadrate ausgezählt und anschließend die Zellzahl aus dem Mittelwert mittels folgender Formel berechnet:

$$2 * \text{Mittelwert} * 10^4 * \text{Volumen der Zellsuspension in ml.}$$

Für die Proteinphosphorylierungsuntersuchungen und die PCR wurden 1,8 bis 2 Mio Zellen in 4 ml Wachstumsmedium auf beschichtete (Poly-D-Lysin) Zellkulturschalen (Durchmesser 6 cm) ausgesät und für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Um Apoptose zu untersuchen wurden die Kardiomyozyten in Chamberslides (250000 Kardiomyozyten/Chamber) oder auf 96 Well-Plates (20000 Kardiomyozyten/Well) ausgesät. Diese waren mit 1% Gelatine und 160 µl Laminin (20 µg/ml) beschichtet. Nach 2 Tagen wurde lichtmikroskopisch unter 10-facher Vergrößerung untersucht, ob die Kardiomyozyten am Schalenboden adhäreren und im Verband schlagen. Dabei wurde eine bakterielle Kontamination ausgeschlossen. Durch Immunfärbung mit α -sarcomerischem Actinin und Kernfärbung mittels 4;6 diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) wurde überprüft, dass es sich bei der isolierten Zellkultur um Kardiomyozyten handelt. Es zeigte sich dabei, dass weniger als 5% der Zellen nichtkardiomyozytär, z.B. Fibroblasten, waren.

3.1.4. Verwendete Medien

Wachstumsmedium:

F10 (HAM + Glutamin), 10% Horse Serum, 5% Fetal Calf Serum, 1% Penicillin und Streptomycin

ADS-Puffer:

NaCl 116 mM, HEPES 20 mM, Na₂HPO₄ 0,8 mM, Glukose 5,6 mM, KCl 5,4 mM, MgSO₄·7H₂O 0,8 mM

Enzymlösung:

Pankreatin 0,6 mg/ml, Collagenase 0,5 mg/ml

3.2. In vitro Modell der Hypoxie/Reoxygenierung isolierter Kardiomyozyten

Nachdem die Zellen mikroskopisch auf spontane Kontraktionen überprüft wurden, wurde das Wachstumsmedium 2 Tage nach der Isolierung und 16 h vor der Stimulierung gegen serumfreies Medium (F10 HAM + Glutamin und 1% Penicillin und Streptomycin) ausgetauscht. Damit wird die unspezifische Phosphorylierung, die durch das serumhaltige Medium induziert wird, reduziert. Dies ist die Voraussetzung um gezielt Veränderungen der Proteinphosphorylierung von Signaltransduktionswegen bestimmen zu können. Gleichzeitig wurde das Hypoxiemedium angesetzt. Das Hypoxiemedium bestand aus serumfreiem Medium. In einer speziellen luftdichten Hypoxiekammer (Billups-Rothenberg, Del Mar, CA USA), in der sich Zellkulturschalen mit dem Medium befanden, wurde der Sauerstoff gegen ein Stickstoffgasgemisch (95% Stickstoff und 5% Kohlendioxid) ausgetauscht, indem die Kammer mit diesem Gasgemisch für 5 min mit 25 l/min durchflutet wurde und anschließend luftdicht verschlossen wurde. Um das Medium anzuwärmen wurde es für 6h bei 37°C inkubiert.

Die isolierten neonatalen Kardiomyozyten wurden in 2 Gruppen aufgeteilt: eine Kontrollgruppe, die nur mit dem Lösungsmittel (3 µl 50% Ethanol in 3 ml Medium) stimuliert wurde und eine Gruppe, die mit Rosiglitazon (10 µmol/l) stimuliert wurde. Beide Gruppen wurden eine halbe Stunde vor der Hypoxie mit der jeweiligen Substanz vorstimuliert. Dann wurde das sauerstoffhaltige serumfreie Medium gegen das zuvor angesetzte Hypoxiemedium ausgetauscht und erneut für 5 min mit 95% Stickstoff und 5% Kohlendioxid durchflutet. Die Hypoxie dauerte 4 Stunden. In jeder Bedingung verblieb jeweils eine Kontrolle in sauerstoffhaltigem Medium. Die zur Stimulation benutzten Substanzen wurden nach jedem Mediumwechsel erneut hinzugegeben. Die Hypoxie wurde von verschiedenen Reoxygenierungszeiten gefolgt. Dabei wurde das stickstoffhaltige Medium abgesaugt und gegen zuvor im Brutschrank unter Standardbedingungen (95% O₂; 5% CO₂) und auf 37 °C vorgewärmtes serumfreies Medium ausgetauscht. Rosiglitazon (10 µmol/l) oder 3 µl 50%iges Ethanol als Lösungsmittelkontrolle wurden jeweils wieder zugeführt. Die Zellen, die stimuliert wurden um die Proteinphosphorylierung zu untersuchen wurden 0, 5, 10, 30 und 60 Minuten reoxygeniert. Um die Auswirkungen auf die Apoptose zu untersuchen, wurden die Zellen 12h reoxygeniert, um die intrazellulären Veränderungen der Apoptose, die ca. 4-12 Stunden benötigen, eindeutiger

nachweisen zu können. (Abb. 3.1.) Um die Effekte des PPAR γ -Agonisten auf die Genexpression der PPAR γ regulierten Gene zu untersuchen, wurden die Kardiomyozyten unter Standardbedingungen (5% Kohlendioxid; 37°C) für 24h mit Rosiglitazon stimuliert.

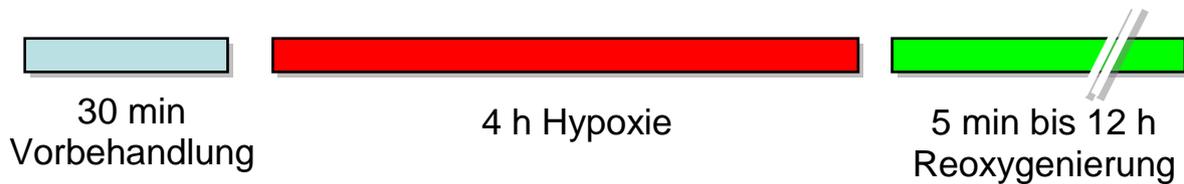


Abb. 3.1. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des Hypoxie/Reoxygenierungsmodells.

3.3. Untersuchung der Genexpression

3.3.1. Isolierung der RNA

Um die Expression der mRNA zu bestimmen, wurde die gesamte RNA aus den Kardiomyozyten mittels eines kommerziell erhältlichen RNA-Isolationskits (peqGoldRNAPure, PeqLab) extrahiert. Durch Abschaben der Zellen von der Zellkutschale und mehrmaliges Aufziehen mit einer Pipette wurden diese lysiert. Mit Chloroform wurden die Proteine von der freigewordenen RNA abgetrennt. Die RNA wurde mit einer Isopropanolpräzipitation konzentriert, durch 75% Ethanol gereinigt und dann in Rnase-freiem Wasser aufgelöst.

3.3.2. Reverse Transkription

Durch die reverse Transkription wurde die isolierte RNA in die komplementäre DNA transkribiert. Um eine einzelsträngige cDNA zu synthetisieren wurde das Omniscript® Reverse Transkriptase Kit (Qiagen) genutzt. Der Mastermix (20 μ l) bestand aus 2 μ g Gesamt-RNA, dem Oligo-dT Primer (1 μ M), je 500 μ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 10 U RNase Inhibitor, 4 U Omniscript Reverse Transkriptase, dem mit dem Enzym erhältlichen Reaktionspuffer und RNA-freiem Wasser. Dieser Mix wurde für 60 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert, anschließend 5 min bei 93 °C im Heizblock erhitzt und dann auf Eis abgekühlt.

3.3.3. Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient dem spezifischen Nachweis der exprimierten mRNA, nachdem diese in einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben wurde. Spezifische Oligonukleotide (Primer) wurden im Überschuss in eine Polymerase-DNA-Synthesereaktion eingesetzt. Das zu untersuchende cDNA-Fragment fungierte als Matrize für die Primer.

Durch wiederholtes zyklisches Erhitzen und Abkühlen dieser Reaktion werden exponentiell neue DNA-Fragmente generiert, die komplementär zur eingesetzten cDNA sind. Die Quantität hängt von der Menge der eingesetzten cDNA, der Zyklenzahl, den angewendeten Temperaturen und der Expression der untersuchten RNA ab. Diese Bedingungen müssen konstant gehalten werden, um unterschiedliche Proben miteinander vergleichen zu können. Durch unterschiedliche Zyklenzahlen wurde bei der Etablierung für jeden Primer sichergestellt, dass die Amplifikation im exponentiell aufsteigenden Bereich der Reaktion durchgeführt wurde. Zusätzlich diente ein externer Standard, ein unter Standardbedingungen in den jeweiligen Zellen nicht reguliertes Gen, als Kontrolle. GAPDH wurde als externer Standard verwendet.

Der Reaktionsansatz bestand aus 1 µl des Aliquots des Master Mixes, 1.5 U Taq DNA Polymerase, 10 mM Tris, 50 mM KCl pH 8.8, DMSO (5% Endkonzentration), je 200 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP und 0.4 µM Oligonukleotid-Primer. Mit Rnase-freiem Wasser wurde auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde in einem Thermozykler mit Heizdeckel (Px2 Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation) durchgeführt. Im Folgenden sind die Bedingungen der Amplifikation dargestellt: Initialisierung 5 min bei 95 °C, Denaturierung 40 s bei 95°C, Annealing (siehe unten), Elongation 40 s bei 72 °C und Endphase 10 min bei 72 °C. Die Zyklenzahl für den jeweiligen Oligonukleotidprimer ist in Abb.3.2. abgebildet (AT= Amplifikationstemperatur).

Primer	Sequenz	AT °C +Zeit	Zyklenzahl
CPT-1	for: 5'-AGT GTG CCA GCC ACA ATT CAC-3'; rev: 5'-GAC TCC ATG CGG AAA TAG GC-3'	54 °C 1 min	26
GAPDH	for: 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'; rev: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'	60 °C 40 s	28

Abb.3.2.: Primersequenz, Annealing und Zyklenzahl

3.3.4. Gelelektrophorese der DNA

16 µl des PCR-Produktes und 4 µl DNA Gel Ladepuffer wurden in einem 1 %igen Agarosegel, das 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthielt, elektrophoretisch mit Hilfe von Tris-Acetat-Elektrophoresepuffer (0,04 M Tris-Acetat, 0,001 M EDTA, pH 8) bei einer konstanten Spannung von 70 V aufgetrennt. Die Banden auf den Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen wurden mit UV-Licht sichtbar gemacht und anschließend mit einem UVP-ImageStore 7500-System (Sony) fotografiert.

3.4. Quantifizierung der Apoptose

3.4.1. Präparation der Zellen zur Untersuchung der Apoptose

Die Apoptose der Kardiomyozyten wurde mit 2 unterschiedlichen Methoden untersucht. Um die Kardiomyozyten für die TUNEL-Färbung zu fixieren, wurden die Zellen nach der Stimulation mit PBS gewaschen und dann 20 Minuten lang mit 4%igem Formalin bei 4°C im Kühlschrank behandelt. Anschließend wurden die Zellen noch 3-mal für 5 Minuten mit eiskaltem PBS gewaschen. Bis zur Auswertung konnten die Zellen dann bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden, wobei diese ständig mit PBS benetzt waren. Der ELISA wurde nach den Herstellerangaben unmittelbar nach der Stimulierung durchgeführt (siehe unten).

3.4.2. TUNEL Färbung

Die Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-End Label (TUNEL) Färbung ist eine Methode um die Fragmentierung der genomischen DNA, wie sie für die Apoptose kennzeichnend ist, sichtbar zu machen. Die entstehenden DNA-Einzelstrangbrüche (nicks) werden in einer enzymatischen Reaktion detektiert, indem die freien 3'-OH DNA-Enden mit markierten Nukleotiden angefärbt werden. Die terminale Deoxynucleotidyl Transferase bindet spezifisch an freie 3'-OH-DNA-Enden,

wodurch Polydeoxynucleotid Polymere entstehen, die durch Antifluorescein-Antikörper mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden können.

3.4.2.1. Permeabilisierung der Zellmembran

Nach der Versuchsdurchführung und der Fixierung mit Formalin wurde die Zellmembran der Kardiomyozyten permeabilisiert. Dazu wurden die Kardiomyozyten in 200 µl kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 200 µl Permeabilisierungslösung 2 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Permeabilisierungslösung besteht aus 0,1% Triton und 0,1% Natrium-Citrat in PBS.

3.4.2.2. Färbung der Einzelstrangbrüche

Für die TUNEL-Reaktion wurden die Zellen nochmals 2 mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 50 µl TUNEL-Reagenz/Kammer, 1 Stunde lang in Dunkelheit bei 37°C, in einer feuchten Kammer inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurden die Zellen 2 mal mit Blocking Puffer gewaschen. Es wurden 200 µl pro Kammer hinzugegeben. Der Blocking Puffer besteht aus 0,1% Triton und 0,5% BSA. Nachdem die Zellen erneut mit PBS gewaschen wurden, konnte die Zellkerngegenfärbung realisiert werden. Dabei wurde 50 µl 4',6-diamidino-2-phenylindole-Mountingmedium (DAPI) (0,1% NP40 in PBS mit 50:1 DAPI verdünnt) auf den Objektträger aufgetragen und 5 min bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. DAPI färbt das Chromatin im Nukleolus an. Anschließend wurden die Objektträger 2 mal mit PBS gewaschen und mit einem Deckglas versiegelt.

3.4.2.3. Auswertung

Die mikroskopische Auswertung erfolgte unmittelbar im Anschluss mit einem Nikon Eclipse E600 Mikroskop um ein Ausbleichen der Färbung zu verhindern. Die Bilder wurden mit Hilfe des Programmes LUCIA G von 2 Personen unabhängig voneinander ausgewertet. Pro Bedingung wurden 4 Versuche durchgeführt und dabei insgesamt 4x18 Bilder pro Bedingung gemacht. Insgesamt wurden zwischen 2000 und 3500 Zellen pro Bedingung ausgezählt. Dabei wurden bei jedem Bild alle DAPI positiven, blau gefärbten Zellkerne gezählt und diese prozentual mit den TUNEL positiven, hochkondensierten, stark fluoreszierenden und mehrfach fragmentierten Kernen verglichen. Die Objektträger wurden anschließend bei 4°C in Dunkelheit gelagert.

3.4.3. Enzym-Linked-Immunosorbant Assay

Der Cell Death Detection Enzyme-Linked-ImmunoSorbant-Assay (ELISA, Roche) ist ein colorimetrischer Assay, der immunochemisch Histone-gebundene-DNA-Fragmente, wie sie bei Apoptose entstehen, ermittelt. Dabei binden Anti-Histone-Biotin-Antikörper, die ihrerseits wandständige Streptavidin-Antikörper binden, an die Nukleosomen aus den zu untersuchenden Zellen. Diese werden durch Anti-DNA-Peroxidase-Antikörper detektiert, die durch das 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazoline-sulfonate) Substrat (ABTS Substrat) gebunden werden. Die Peroxidase wandelt das ABTS Substrat in eine colorimetrisch detektierbare Form um.

3.4.3.1. Permeabilisierung der Zellmembran

Nach der Stimulation der Kardiomyozyten wurden die Platten mit den Zellen bei 1500 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert. Dies entspricht $200 \cdot g$ ($1g = 9,81 \text{ m/s}^2$). Der Überstand wurde abpipettiert und die Zellen 3-mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Dann wurden 200 μl Lysepuffer hinzugegeben und die Kardiomyozyten 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat wurde anschließend 10 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert und anschließend 20 μl vom Überstand in die mit Streptavidin beschichteten Microplate Module gegeben. Bei jedem Versuch lief eine Positiv-, eine Negativ- und eine Hintergrundkontrolle mit.

3.4.3.2. Enzym-Linked-Immunosorbant Assay

Zu den 20 μl Überstand wurden 80 μl Immunoreagent pipettiert, der sich aus 5% Anti-Histon-Biotin Lösung, 5% Anti-DNA-POD Lösung und 90% Inkubationspuffer (als Fertiggemisch im Roche-Set enthalten) zusammensetzt. Dieser Immunoreagent wurde jeweils frisch angesetzt. Die Microplates wurden mit Folie abgedeckt und 2 Stunden auf einem Schüttler bei 300 U/min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die 100 μl Inhalt wurden anschließend aus den Microplate abgesaugt, diese 3 mal mit 300 μl Inkubationspuffer ausgespült und die ABTS Lösung hinzugegeben, die für die Farbentwicklung nötig ist. Die kräftigste Farbentwicklung ergab sich bei einer Inkubationszeit von 20 min auf einem Schüttler mit 300 U/min unter Raumtemperatur.

3.4.3.3. Auswertung

Die photometrische Auswertung erfolgte nach 20 min Inkubationszeit und wurde gegen 405 nm Wellenlänge und 490 nm Referenzwellenlänge mit einem Spectra Classic Photometer von Tecan ausgemessen..

3.5. Immunoblot

3.5.1. Proteinisolierung

Für die Proteinanalysen wurde das Medium nach der experimentellen Stimulierung der Kardiomyozyten abgeaugt, die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und mit einem Zellschaber in Gegenwart von 150 µl eines Zellysepuffers (20 mM HEPES, pH 7,4, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100, 10% Glycerol, 400 µM PMSF, 2 µM Leupeptin, 10 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml E 64, 2 µM Microcystin, 50 mM β-Glycerophosphat, ad 2 ml Aqua dest) abgeschabt. Durch Vortexen wurde die Zellyse unterstützt. Die Eppendorfgefäße mit dem Lysat wurden 20 Minuten auf Eis belassen, bevor sie mit 14000 U/min bei 4°C zentrifugiert wurden, um die Zell- und Organellenmembranen vom Zytosol mit den darin befindlichen Proteinen zu trennen. Der Überstand wurde anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

3.5.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung wurde in Dreifachbestimmung mittels des Bio-Rad DC assays durchgeführt. Dieser stellt eine modifizierte Ausführung der colorimetrischen Methode von Lowry et al (1951) dar. Es wurden Proteinproben mit einer Verdünnung von 1/20 angefertigt, sowie eine Blindprobe ohne Proteine. Die Messung erfolgte nach 15 min in einem Beckmann DU-600 Photometer bei 750 nm.

3.5.3. Proteingelelektrophorese

Die in Probenpuffer (2 ml Glycerol, 2 ml 10% SDS, 0,025 mg Bromphenolblau, 2,5 ml Stacking Gel Puffer (6,06 g TRIS, 4 ml 10% SDS ad 100 ml, pH 6,8), 1 ml 1M DTT, ad 10 ml Aqua dest) verdünnten und 5 min bei 95 °C gekochten Proteinproben wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Je nach Proteingröße betrug der Polyacrylamidanteil zwischen 8 und 12,5% und pro Slot wurden 40 µg Protein

eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte während 60-80 min bei einer Stromstärke von 75 mA. Parallel zu den Proben liefen Molekulargewichts-Standards mit (High-Range Proteinmarker von Sigma Aldrich), Rainbowmarker von Amersham Bioscience).

3.5.4. Proteintransfer

Nach der Auftrennung wurden die Proteine im Semi-Dry-Verfahren mittels eines diskontinuierlichen Puffersystems auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland) übertragen. Das blasenfrei auf die Nitrocellulosemembran (0,2 µm Porendurchmesser) gelegte Gel wurde zusammen mit dieser zwischen mehrere Lagen Filterpapier gelegt. Diese waren mit Anodenlösung (9,7g Tris Base, 45g Glycin und 800 ml Methanol, ad 4l Aqua dest) getränkt. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte mittels einer Stromstärke von 300 mA während 80 min. Mit der Ponceau-Färbung wurde das Ergebnis des elektrophoretischen Transfers kontrolliert. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren wurde die Membran für 30 min in 5% Milchlösung in PBS-Tween inkubiert.

3.5.5. Antikörperinkubation, Entwicklung und Auswertung

Die Membran wurde über Nacht bei 4°C mit dem jeweiligen primären Antikörper auf einer rotierenden Platte inkubiert. Der Antikörper war in 5% Milchlösung in PBS-Tween in Konzentrationen von 1/500 – 1/1000 gelöst. Nach anschließendem 3 maligem Waschen in PBS-Tween 0,1% wurde die Membran für 1h mit dem, ebenfalls in 5% Milchlösung und PBS-Tween gelösten, sekundären Antikörper (Konzentration 1/5000) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran wieder 3mal für 5 min in PBS-Tween 0,1% gewaschen und mittels eines Chemilumineszenz-Western-Blot-Detection-Reagenz (ECL, Amersham Bioscience) ausgewertet. Durch eine Peroxidase-vermittelte Chemilumineszenzreaktion erfolgte hier die Schwarzfärbung des aufgelegten Röntgenfilms im Bereich der Antikörper-markierten Banden. Als Entwickler diente Agfa Curix 60. Die Bilder wurden gescannt und mit der UVP Labworks Analysis Software densitometrisch ausgewertet.

3.6. Verwendete Substanzen

3.6.1. Substanzen für die Zellkultur

- F10 (HAM + Glutamin), GIBCO, 31550-031 Invitrogen
- 10% Horse Serum, GIBCO, 16050-122 Invitrogen
- 5% Fetal Calf Serum, GIBCO, 16170-078 Invitrogen
- 1% Penicillin und Streptomycin, GIBCO, 15140-122 Invitrogen
- F10 (HAM + Glutamin), GIBCO, 31550-031 Invitrogen
- 1% Penicillin und Streptomycin, GIBCO, 15140-122 Invitrogen
- Neonatal Calf Serum, GIBCO, 16010-159 Invitrogen
- Pankreatin (P-3292) Sigma-Aldrich
- Collagenase Type 2 Worthington Bio

3.6.2. Substanzen für die Untersuchung der Genexpression

- OMNISCRIPT® Reverse Transcription Kit Qiagen
- PeqGOLD dNTP – Mix Peqlab
- PeqGOLD Universal Agarose Peqlab
- PeqGOLD RNAPure Peqlab
- DNA Ladder, 100-850 bp Invitrogen
- Primer für PCR MWG Bio

3.6.3. Substanzen für die Quantifizierung der Apoptose

- Cell-Death-Detection-ELISA^{plus}-Kit Roche
- T.U.N.E.L. Staining-Kit Roche

3.6.4. Substanzen für die Untersuchung der Proteinexpression

- Dc Protein Assay Reagenz A Nr: 500-0114 Bio-Rad
- Dc Protein Assay Reagenz B Nr: 500-0113 Bio-Rad
- Acrylamide/Bis Solution 29:1 Nr: 161-0156 Bio-Rad
- Full-Range-Rainbow (RPN 800) Amersham B.
- High-Range-Marker Nr: M-3788 Sigma Aldrich
- Low-Range-Marker Nr: M-3913 Sigma Aldrich

- Phospho-Akt (Ser 473) Nr: 9271 Cell Signaling
- Akt-Antibody Nr: 9272 Cell Signaling
- Phospho-GSK-3 β (Ser 9) Nr: 9336 Cell Signaling
- GSK-3 β -Antibody Nr. 9315 Cell Signaling
- Phospho-SAPK/JNK Nr: 9255 Cell Signaling
- Phospho-p44/42 MAPK Nr: 9101 Cell Signaling
- Phospho-PTEN (Ser 380) Nr: 9551 Cell Signaling
- Erk-1/2 (C-16) sc- 93 Santa Cruz
- Calsequestrin 1 (C15) sc-16573 Santa Cruz
- Anti-Rabbit IgG Nr: A 9169 Sigma-Aldrich
- Anti-Mouse IgG Nr: A 5278 Sigma-Aldrich
- Anti-Goat IgG Nr: A 5420 Sigma-Aldrich

3.6.5. Sonstige Substanzen

- Natriumchlorid Sigma-Aldrich
- HEPES Sigma-Aldrich
- Glukose Sigma-Aldrich
- Kaliumchlorid Sigma-Aldrich
- EGTA Sigma-Aldrich
- DTT Sigma-Aldrich
- Glycerol Sigma-Aldrich
- PMSF Sigma-Aldrich
- Triton X Sigma-Aldrich
- Leupeptin Sigma-Aldrich
- Aprotinin Sigma-Aldrich
- E 64 Sigma-Aldrich
- Microcystin Sigma-Aldrich
- β -Glycerophosphat Sigma-Aldrich
- Tris-Acetat Sigma-Aldrich
- APS Sigma-Aldrich
- TEMED Sigma-Aldrich
- Glycin Sigma-Aldrich
- Mercapto-EtOH Sigma-Aldrich

- Bromophenol-blue
- Ponceau S
- Gelatine
- GW 9662

Sigma-Aldrich
Serva
Fluka
Cayman Chemical

3.7. Statistik

Die angegebenen Daten wurden als Mittelwert (AVG) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Durch den Student's T-Test wurde die statistische Signifikanz ermittelt und diese wurde für $p < 0,05$ angenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Wirkung von Rosiglitazon auf die Expression des PPAR γ -regulierten Gens CPT-1 in isolierten neonatalen Kardiomyozyten.

Um die Wirkung von Rosiglitazon auf die Expression PPAR γ -regulierter Gene in isolierten Kardiomyozyten zu untersuchen, wurde die mRNA des PPAR γ -Zielgens CPT-1 nach 24 h Rosiglitazonbehandlung untersucht. Es sind Effekte von PPAR γ -Agonisten an Kardiomyozyten beschrieben und es konnte gezeigt werden, dass der PPAR γ -Rezeptor und PPAR γ -regulierte Gene wie CPT-1 in Kardiomyozyten exprimiert werden. Es ist jedoch unklar, ob PPAR γ -Agonisten zu einer Expression dieser Gene in Kardiomyozyten führen oder ob die Effekte von PPAR γ -Agonisten rezeptorunabhängig sind. Abbildung 4.1. zeigt ein repräsentatives Experiment das die mRNA Expression von CPT-1 (PPAR γ -Zielgen) und GAPDH (Housekeeping-Gen) in Kardiomyozyten darstellt, die mit Rosiglitazon (10 μ mol/l) oder Lösungsmittel (3 ml 50% Ethanol) stimuliert wurden.

Die Expression des PPAR γ -Zielgens CPT-1 war unter der Stimulation des PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon in isolierten Kardiomyozyten erhöht. Die Expression von CPT-1 war signifikant ($p < 0,03$) um 70% erhöht nach 24stündiger Rosiglitazonstimulation, während die Expression von GAPDH als Housekeeping-Gen konstant bleibt. Dies legt nahe, dass PPAR γ -Agonisten auch direkt in Kardiomyozyten den PPAR γ -Rezeptor stimulieren und somit auch direkt am Kardiomyozyten wirken können.

PPAR γ -Agonisten induzieren das PPAR γ Zielgen CPT-1 in isolierten neonatalen Kardiomyozyten

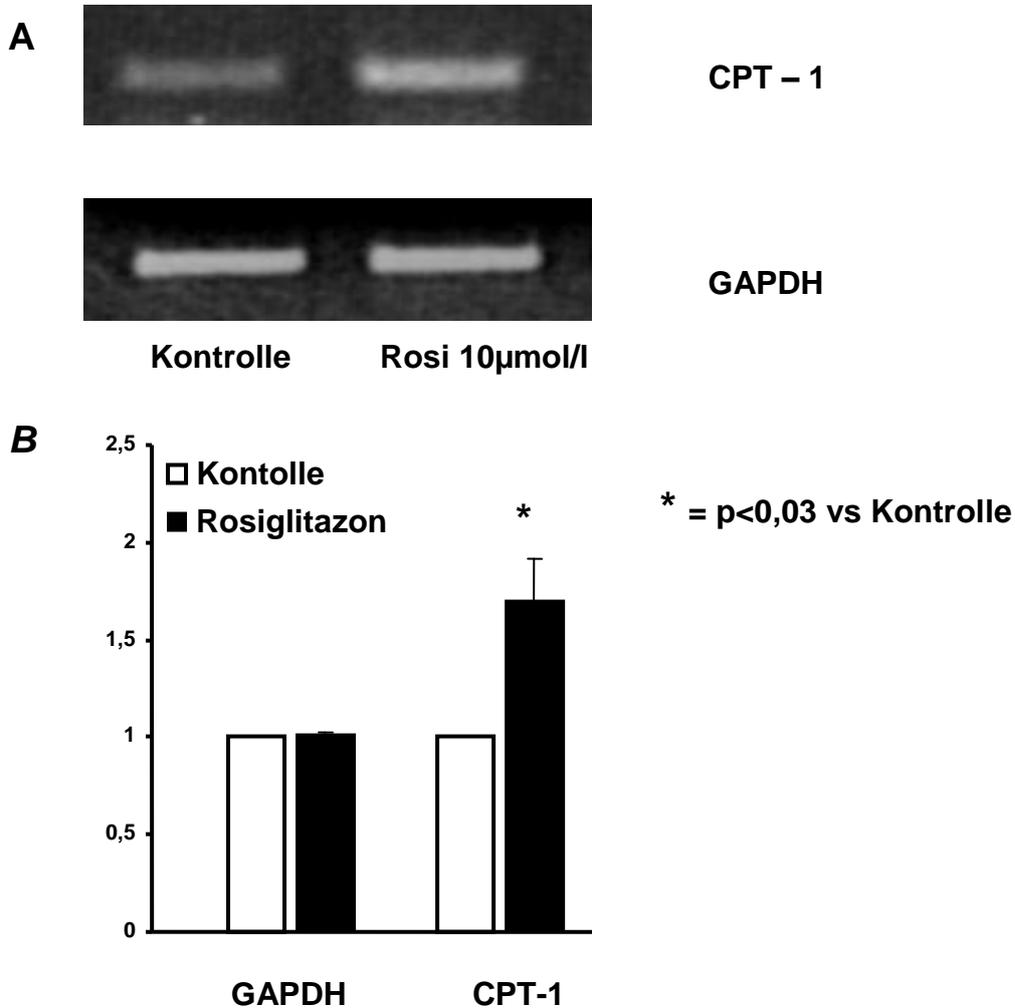


Abbildung 4.1: A: Repräsentatives Experiment einer semiquantitativen PCR für die Expression des PPAR γ -regulierten Gens CPT-1 in Gegenwart von Rosiglitazon (10 μ mol/l), bzw. Lösungsmittel (Kontrolle) in isolierten Kardiomyozyten. GAPDH diente als House-Keeping-Gen. B: Quantifizierung von 3 unabhängigen Experimenten zur Gen-Expression von CPT-1. Es zeigte sich, dass die Expression von CPT-1 in Gegenwart von Rosiglitazon signifikant ($p < 0,03$) verstärkt war.

4.2. Wirkung des PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon auf die Apoptose isolierter Kardiomyozyten bei Hypoxie/Reoxygenierung

In vivo Experimente zeigten, dass PPAR γ -Agonisten protektiv auf das Myokard bei Ischämie/Reperfusion wirken. Es ist allerdings unklar, ob dieser Effekt indirekt, z.B. über antiinflammatorische Effekte vermittelt ist oder ob PPAR γ -Agonisten unter diesen Bedingungen direkt protektiv auf Kardiomyozyten wirken. Um die Wirkung von PPAR γ -Agonisten (Rosiglitazon 10 $\mu\text{mol/l}$) auf die Apoptose isolierter neonataler Kardiomyozyten bei Hypoxie/Reoxygenierung zu untersuchen, wurden 2 unabhängige Methoden zur Apoptose-Detektion angewandt. Einerseits wurde die Apoptose der isolierten Kardiomyozyten basal, nach 4h Hypoxie und nach 12h Reoxygenierung mittels einer Fluoreszenz-Färbung (TUNEL-Färbung) bestimmt. Ergänzend wurde nach 4h Hypoxie und 12h Reoxygenierung photometrisch mittels eines ELISA die fragmentierte DNA quantitativ, als zweite und untersucherunabhängige Methode der Detektion der Apoptose, bestimmt.

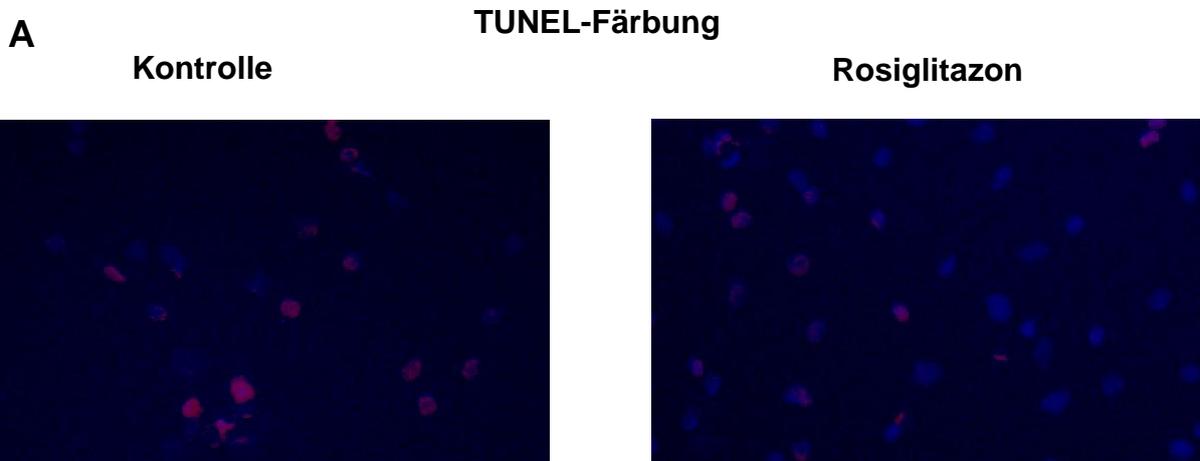
In der TUNEL-Färbung zeigte sich nach 4h Normoxie kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den mit Rosiglitazon behandelten Kardiomyozyten. Von den 2126 ausgezählten Zellen waren 274 in der Kontrollgruppe apoptotisch. Das waren 12,9% \pm 2,3%. In den mit Rosiglitazon behandelten Zellen waren 330 der 2908 Zellen apoptotisch (11,4% \pm 2,5%). Die Apoptoserate stieg durch die 4-stündige Hypoxie deutlich an. In der Kontrollgruppe waren 659 der 2581 Zellen apoptotisch und in der Rosiglitazongruppe waren dies 465 der 1951 ausgezählten Zellen. Das waren 25,5% \pm 3,8% bzw. 23,9% \pm 5,2%. Es ließ sich allerdings nach 4h Hypoxie kein signifikanter Unterschied in der Apoptose zwischen beiden Gruppen feststellen. Nach 12h Reoxygenierung zeigte sich bei der Kontrollgruppe ein weiterer Anstieg der Apoptose um 33,7% auf 34,1 % \pm 2,9% (976 der 2862 ausgezählten Zellen), während dieser Anstieg bei den mit Rosiglitazon behandelten Zellen vollständig inhibiert werden konnte. Hier färbten sich 26,4% \pm 2,0% der Kardiomyozyten positiv in der TUNEL-Färbung (765 von 2899 Zellen). Dies entspricht nach 4h Hypoxie und 12h Reoxygenierung einer signifikanten Reduktion der Apoptose um 23% ($p < 0,05$) bei den mit dem PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon behandelten Zellen. (Abbildung 4.2.)

Im ELISA war die Apoptose in den mit Rosiglitazon behandelten Kardiomyozyten signifikant um 35% geringer als in der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Die Absorption, die

den Anteil der fragmentierten DNA widerspiegelt, erreichte in der Kontrollgruppe einen Wert von $1,10 \pm 0,21$ und in den mit dem PPAR γ -Agonisten behandelten Kardiomyozyten einen Wert von $0,72 \pm 0,14$. (Abbildung 4.3.)

Während basal und nach 4h Hypoxie kein Effekt von Rosiglitazon auf die Apoptose isolierter Kardiomyozyten nachzuweisen war, konnte durch die Behandlung mit dem PPAR- γ Agonisten die durch die Reoxygenierung induzierte Apoptose nahezu vollständig inhibiert werden. Dies spricht für eine wichtige Bedeutung von PPAR γ bei der Protektion des Herzens bei Ischämie/Reperfusion über einen direkten Effekt auf die Kardiomyozyten.

PPAR γ -Agonisten reduzieren die Apoptose in isolierten neonatalen Kardiomyozyten bei Hypoxie/Reoxygenierung



B

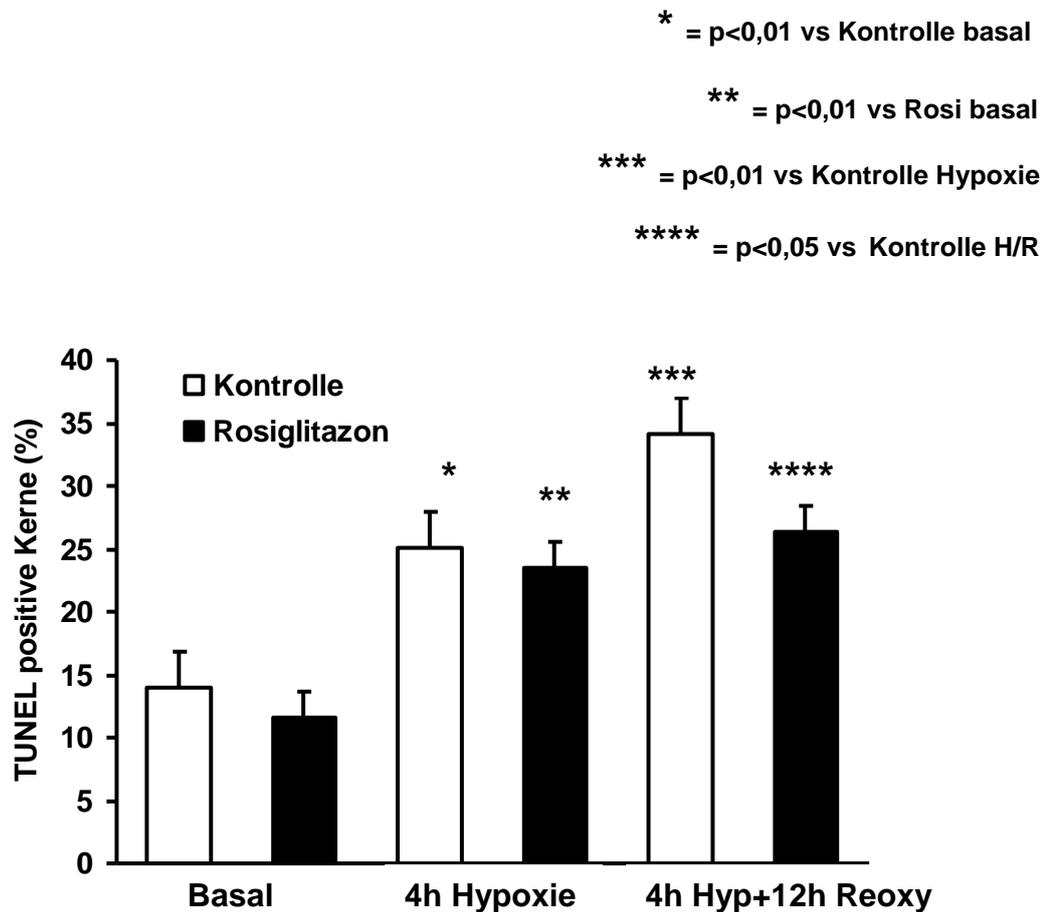


Abb. 4.2.: TUNEL-Färbung. A: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Bilder intakter (blau) und apoptotischer (rot) Zellkerne isolierter Kardiomyozyten. B: Zusammenfassende Darstellung von 4 unabhängigen Experimenten: Nach 4 h Hypoxie und 12 h Reoxygenierung war die Apoptose in den Rosiglitazon (10 $\mu\text{mol/l}$) behandelten Zellen signifikant um 23% reduziert ($p < 0,05$).

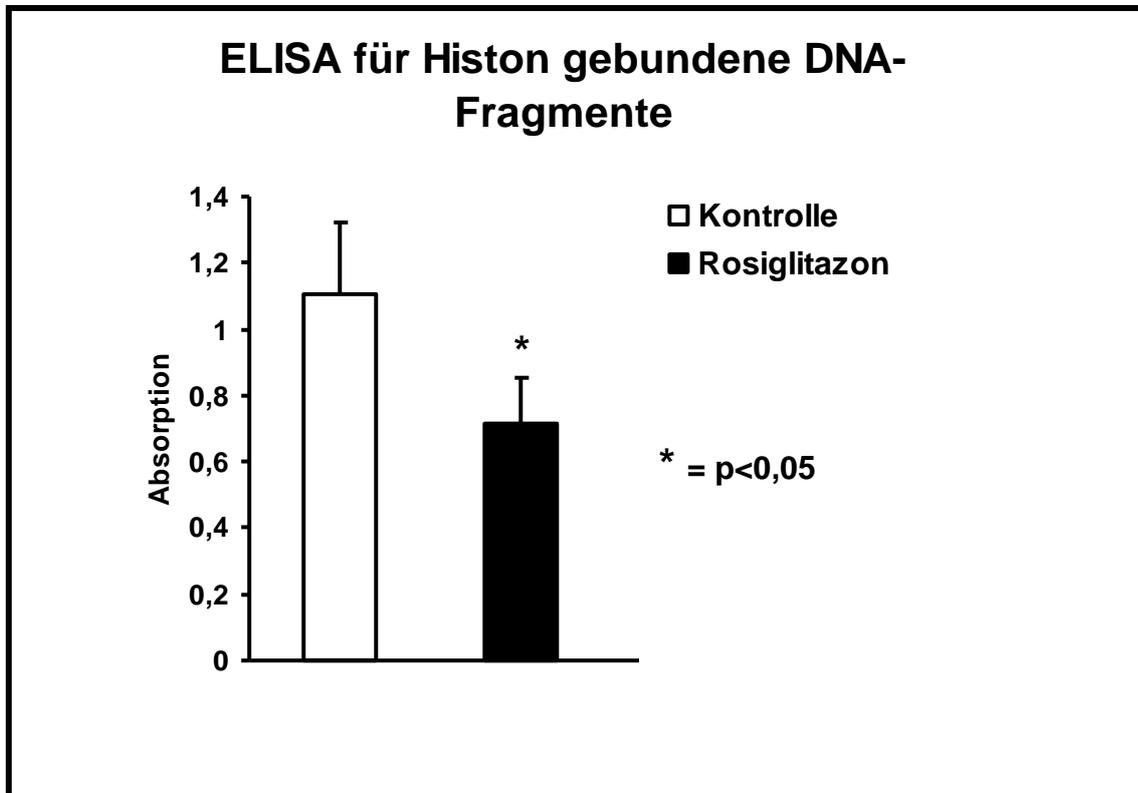


Abb. 4.3.: Zusammenfassende Darstellung von 4 unabhängigen Experimenten des ELISA zur quantitativen Bestimmung der Apoptose in isolierten Kardiomyozyten. Nach 4 h Hypoxie und 12 h Reoxygenierung war die Absorption, die durch den Anteil der fragmentierten DNA bestimmt wird, in den mit Rosiglitazon (10 $\mu\text{mol/l}$) behandelten Proben signifikant um 35% reduziert ($p<0,05$).

4.3. Molekulare Effekte von Rosiglitazon in Kardiomyozyten bei Hypoxie/Reoxygenierung

4.3.1. Regulation der Proteinkinase Akt-abhängigen Signaltransduktion durch Rosiglitazon bei Hypoxie/Reoxygenierung

Die Aktivierung der Proteinkinase Akt bei Hypoxie-/Reoxygenierung ist einer der wesentlichen Mechanismen, über den antiapoptotische Effekte in Kardiomyozyten vermittelt werden. Um zu untersuchen, ob die Reduktion der Apoptose durch Rosiglitazon bei der Reoxygenierung isolierter Kardiomyozyten über die Aktivierung von Akt vermittelt wird, wurde die Phosphorylierung der Phosphorylierungsstelle Ser 473 unter basalen Bedingungen, nach 4h Hypoxie und nach verschiedenen Reoxygenierungszeiten mittels Immunoblots mit phosphospezifischen Antikörpern bestimmt.

Unter basalen Bedingungen war die Phosphorylierung von Akt in Kontrollzellen, die mit dem Lösungsmittel Ethanol behandelt wurden, sowie in Rosiglitazon (10 µmol/l) behandelten Kardiomyozyten gleich. Nach 4h Hypoxie war die Phosphorylierung von Akt vermindert, es gab hierbei allerdings keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Durch die Reoxygenierung wurde die Proteinkinase Akt wieder rephosphoryliert. Diese frühe reoxygenierungsbedingte Rephosphorylierung von Akt wurde signifikant durch Rosiglitazon verstärkt. (Reoxygenierungszeitpunkte 5 und 10 min). Während die Phosphorylierung von Akt in den Lösungsmittel-behandelten Kardiomyozyten das basale Niveau erreichte, stieg diese in den mit Rosiglitazon behandelten Zellen etwa auf das Doppelte des basalen Niveaus an. Im weiteren Verlauf nahm dieser Effekt wieder ab. Nach 30 und 60 Minuten war die Phosphorylierung von Akt in der Rosiglitazongruppe wieder auf basalem Niveau und es bestand kein Phosphorylierungsunterschied zwischen den mit Rosiglitazon behandelten und den mit Ethanol behandelten Zellen. Die Akt-Gesamtproteinmenge blieb dabei zu allen Zeitpunkten und in beiden Gruppen konstant. Das Lösungsmittel hatte dabei keinen Einfluss auf die Effekte. (Abbildung 4.4.)

Der Effekt von Rosiglitazon auf die Phosphorylierung von Akt nach 5 minütiger Reoxygenierung nahm dabei konzentrationsabhängig, ab einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$, zu. Der Effekt war also konzentrationsabhängig. (Abbildung 4.5.)

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Reduktion der Apoptose bei den mit Rosiglitazon behandelten Kardiomyozyten während der Reoxygenierung, zumindest zum Teil, durch eine verstärkte Rephosphorylierung der Proteinkinase Akt bei der Reoxygenierung vermittelt zu sein scheint.

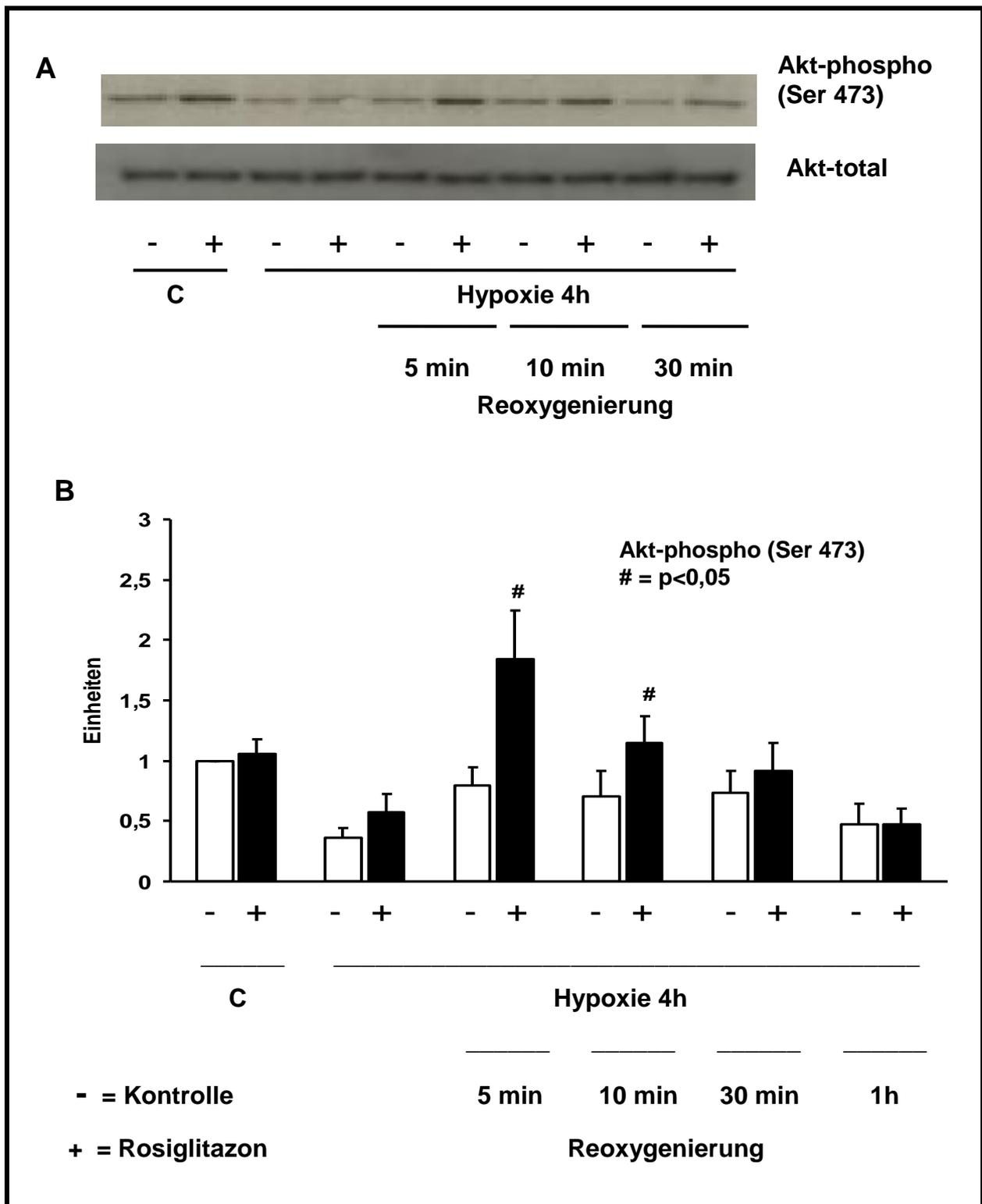
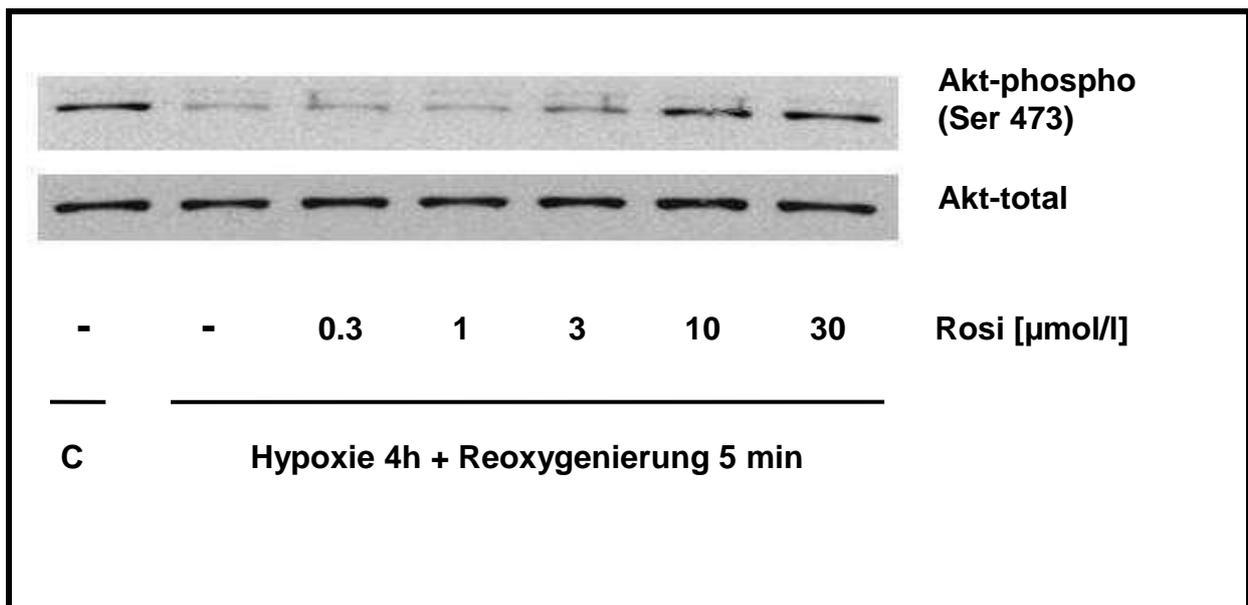


Abb. 4.4.: A: Repräsentativer Immunoblot für die Phosphorylierung von Akt und die Akt-Gesamt-Proteinexpression. B: Mittelwert +/- SEM von 9 unabhängigen Experimenten für die Phosphorylierung von Akt (Ser 473). Nach 4h Hypoxie und 5 bzw. 10 min Reoxygenierung war die reoxygenierungsbedingte Rephosphorylierung signifikant ($p < 0,05$) in der mit Rosiglitazon ($10 \mu\text{mol/l}$) behandelten Gruppe verstärkt.



4.5.: Repräsentativer Immunoblot von 3 unabhängigen Experimenten für die Dosisabhängigkeit der Phosphorylierung von Akt (Ser 473) in Gegenwart von Rosiglitazon: Ab einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ Rosiglitazon stieg die Phosphorylierung von Akt nach 4h Hypoxie und 5 min Reoxygenierung konzentrationsabhängig an. Die Akt-Gesamtproteinmenge war dabei immer konstant.

Um zu überprüfen, ob der Effekt von Rosiglitazon auf die Phosphorylierung von Akt ein PPAR γ -abhängiger Effekt ist oder ob dieser über PPAR γ -unabhängige Mechanismen zustande kommt, wurden die Kardiomyozyten zusätzlich mit dem PPAR γ Inhibitor GW 9662 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI USA) in einer Dosierung von 0,1 μ mol/l behandelt. Die Überprüfung des Effektes erfolgte zum Zeitpunkt der maximalen Akt Phosphorylierung, nämlich nach 4h Hypoxie und 5 min Reoxygenierung.

Die reoxygenierungsbedingte Rephosphorylierung von Akt war in Gegenwart von Rosiglitazon im Vergleich zu den Kontrollbedingungen verstärkt. Dieser Effekt war durch die Inhibierung des PPAR γ -Rezeptors mittels des GW 9662 Inhibitors partiell antagonisierbar (Abb. 4.6.). Dies legt nahe, dass die bei Hypoxie/Reoxygenierung verstärkte Rephosphorylierung von Akt durch Rosiglitazon nicht über rezeptorunabhängige Mechanismen, sondern über die Aktivierung des PPAR γ -Rezeptors vermittelt wird. GW 9662 allein hatte keinen Effekt im Vergleich zu den Kontrollen.

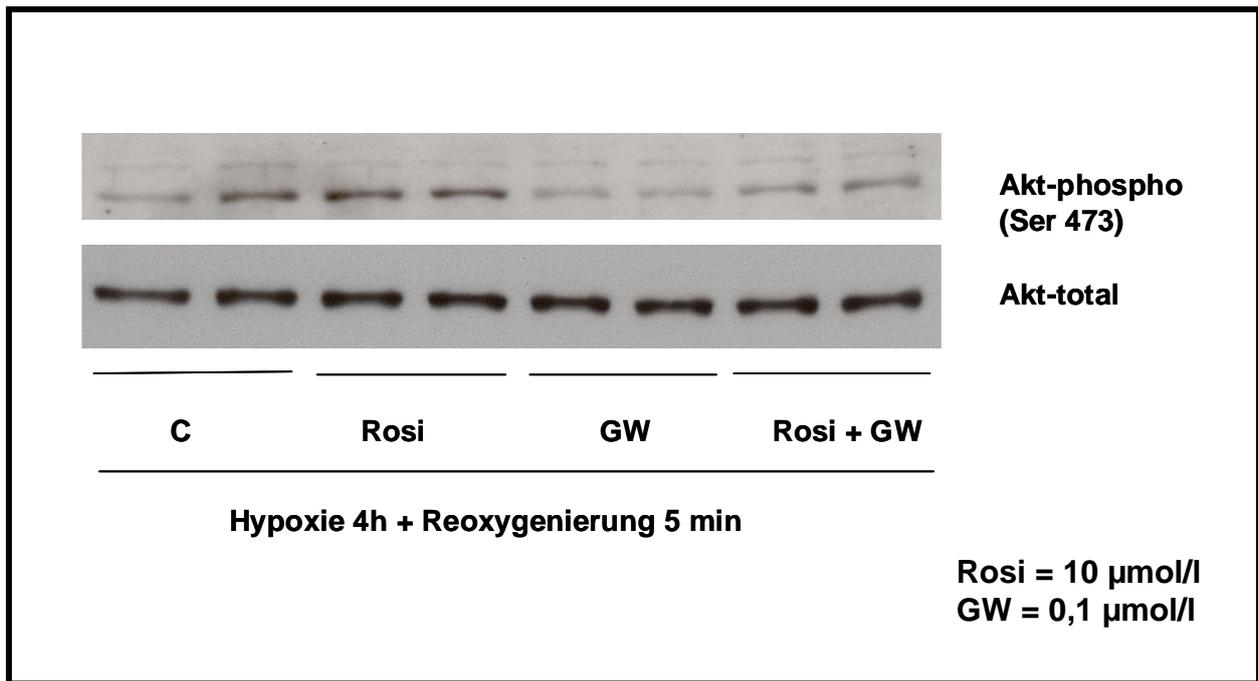


Abb. 4.6. : Repräsentativer Immunoblot von 3 unabhängigen Experimenten. Die durch Rosiglitazon (10 µmol/l) verstärkte reoxygenierungsbedingte Rephosphorylierung von Akt war durch die Zugabe des PPAR γ -Inhibitors GW 9662 (0,1 µmol/l) fast vollständig aufgehoben.

Die bisher gezeigten Ergebnisse legen nahe, dass der antiapoptotische Effekt von Rosiglitazon in Kardiomyozyten bei der Reoxygenierung zumindest zum Teil über die Proteinkinase Akt vermittelt zu sein scheint. Apoptose in Kardiomyozyten wird unter anderem über eine Regulation von GSK-3 β vermittelt. GSK-3 β ist im dephosphorylierten Zustand aktiviert und kann so z.B. bei Hypoxie Apoptose vermitteln. Akt inaktiviert GSK-3 β durch Phosphorylierung der Ser 9 Phosphorylierungsstelle und kann u.a. über diesen Mechanismus Apoptose von Kardiomyozyten bei Hypoxie/Reoxygenierung reduzieren. Um zu überprüfen, ob die verstärkte Rephosphorylierung der Proteinkinase Akt bei der Reoxygenierung in Gegenwart von Rosiglitazon die Phosphorylierung und damit die Aktivität von GSK-3 β beeinflusst, wurde die Phosphorylierung der Ser 9 Phosphorylierungsstelle von GSK-3 β bei der Reoxygenierung überprüft.

Unter basalen Bedingungen war Serin 9 an GSK-3 β nur schwach phosphoryliert. GSK-3 β (Ser 9) wurde bei der Reoxygenierung zu den initialen Zeitpunkten (5 und 10 min) verstärkt phosphoryliert. Die Phosphorylierung war in Gegenwart von Rosiglitazon (10 μ mol/l) nach 10 min Reoxygenierung analog zur Phosphorylierung von Akt signifikant ($p < 0,05$) stärker ausgeprägt als in den Kontrollzellen. Die Phosphorylierung nahm mit zunehmender Dauer der Reoxygenierung wieder ab. Nach 30 und 60 minütiger Reoxygenierung war die Phosphorylierung wieder auf basalem Niveau und zwischen den Kontrollzellen und den mit Rosiglitazon behandelten Zellen angeglichen. (Abbildung 4.7.)

Die verstärkte reoxygenierungsbedingte Inaktivierung von GSK-3 β unter Rosiglitazon könnte einen Mechanismus darstellen, wie die antiapoptotischen Effekte von Rosiglitazon auf die Kardiomyozyten über die Proteinkinase Akt vermittelt werden.

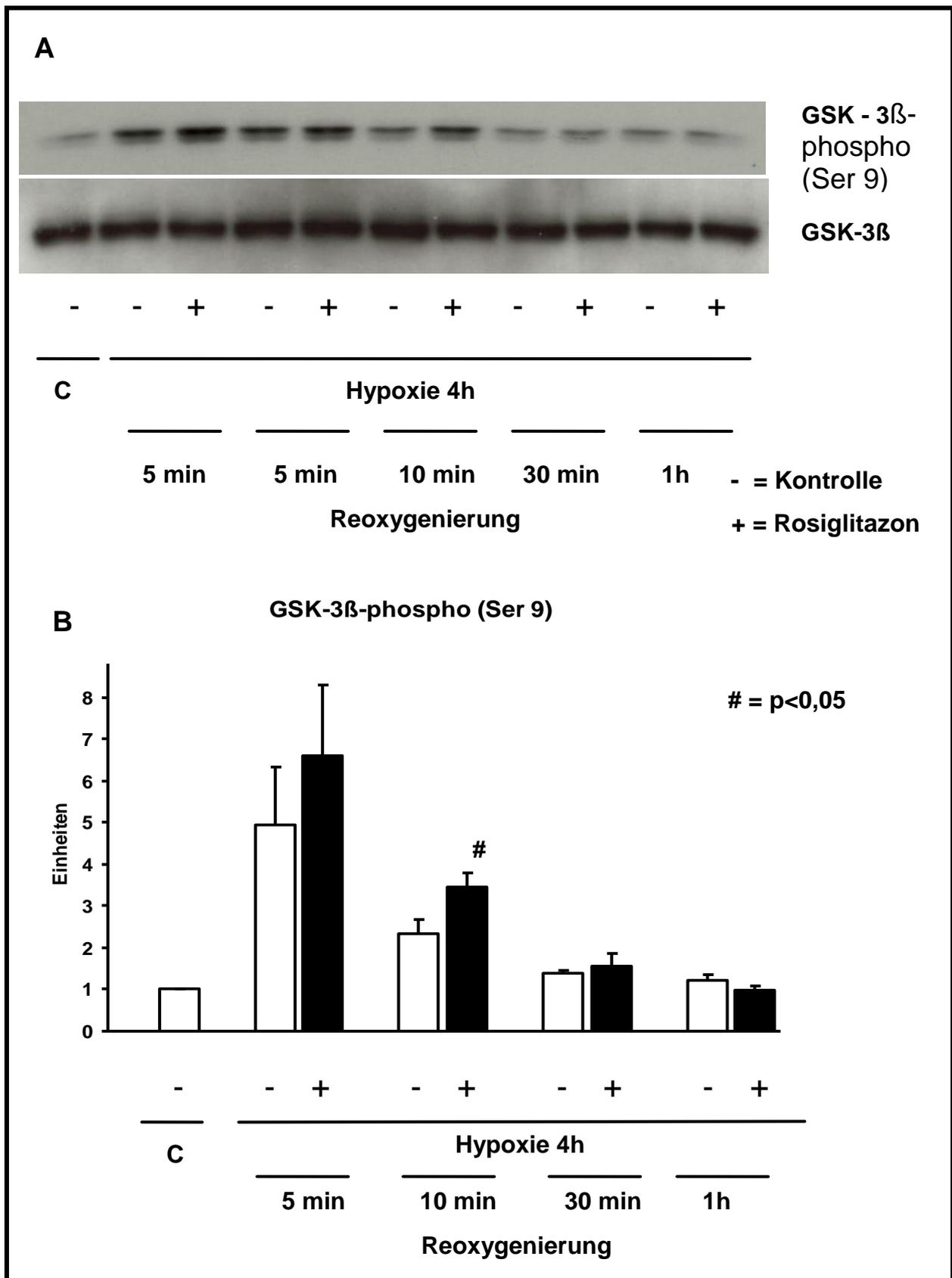


Abb.4.7.: A: Repräsentativer Immunoblot von 3 unabhängigen Experimenten für die Phosphorylierung an der Serine 9 Phosphorylierungsstelle von GSK-3β. B: Mittelwert +/- SEM aus 3 unabhängigen Experimenten: Die Phosphorylierung von GSK-3β war nach 10 min Reoxygenierung unter Rosiglitazon signifikant ($p < 0,05$) verstärkt.

Um zu überprüfen ob der Effekt von Rosiglitazon auf die Phosphorylierung von Akt bei der Reoxygenierung der Kardiomyozyten ein spezifischer Effekt ist oder ob Rosiglitazon unspezifisch die Phosphorylierung von Akt (Ser 473) verstärkt, wurden die Kardiomyozyten basal und nach 4h Hypoxie mit IGF-1 in verschiedenen Konzentrationen in Gegenwart von Rosiglitazon, bzw. der Lösungsmittelkontrolle stimuliert. IGF-1 ist ein potenter Aktivator der Proteinkinase Akt.

Die Kardiomyozyten wurden 4,5h mit Rosiglitazon oder dem Lösungsmittel Ethanol vorbehandelt und die IGF-1 induzierte Phosphorylierung von Akt wurde dosisabhängig bestimmt. Rosiglitazon verstärkte die IGF-1-induzierte Phosphorylierung von Akt unter basalen Bedingungen nicht. Interessanterweise war sogar nach 4h Hypoxie, die IGF-1-induzierte Phosphorylierung von Akt in den mit Rosiglitazon behandelten Zellen nicht verstärkt. (Abbildung 4.8.)

Dies legt nahe, dass Rosiglitazon nicht direkt die Rezeptor-Tyrosinkinase-getriggerte Phosphorylierung von Akt verstärkt, sondern, dass der Effekt von Rosiglitazon auf die Phosphorylierung von Akt spezifisch für die frühen Zeitpunkte der Reoxygenierung nach einer Hypoxie zu sein scheint.

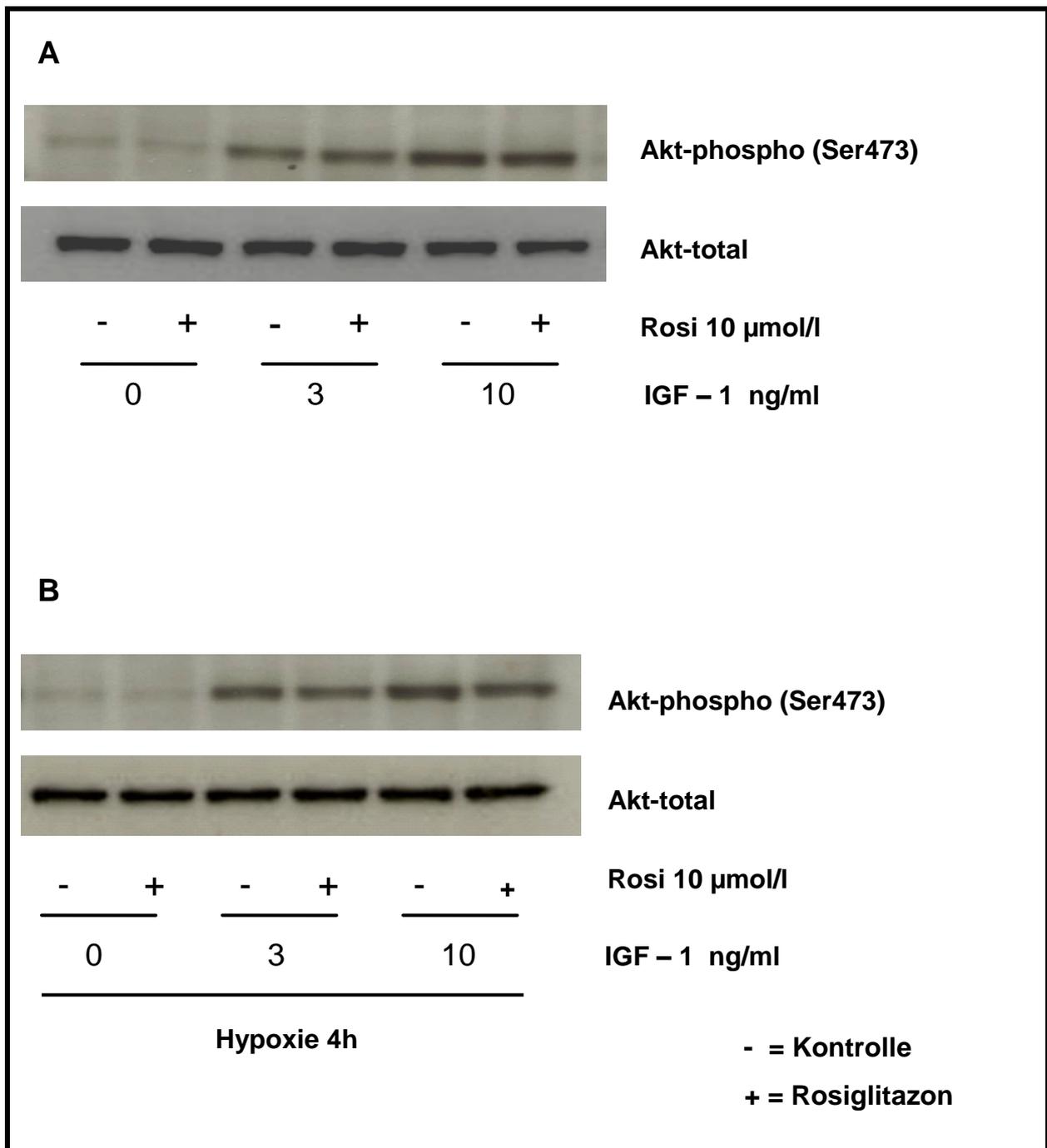


Abb. 4.8.: A: Repräsentativer Immunoblot von 3 unabhängigen Experimenten: Die Phosphorylierung von Akt unter basalen Bedingungen nahm mit zunehmender IGF-1 Konzentration zu. Dieser Effekt war in Gegenwart von Rosiglitazon unverändert. B: Repräsentativer Immunoblot von 3 unabhängigen Experimenten: Auch nach 4h Hypoxie verstärkte Rosiglitazon die dosisabhängige IGF-1-vermittelte Phosphorylierung von Akt nicht.

4.3.2. Effekte von Rosiglitazon auf die MAP Kinasen (ERK 1/2 und JNK) bei Hypoxie/Reoxygenierung isolierter Kardiomyozyten

Die Phosphorylierung und damit die Aktivierung der MAPK ERK 1/2 stellt einen PI3K-unabhängigen antiapoptotischen Signalweg in Kardiomyozyten bei Hypoxie/Reoxygenierung dar. Um zu überprüfen, ob die antiapoptotischen Effekte von Rosiglitazon in Kardiomyozyten bei der Reoxygenierung durch eine Aktivierung der MAPK ERK 1/2 vermittelt sein könnten, wurde die Phosphorylierung dieser Proteinkinasen unter basalen Bedingungen, sowie nach 4h Hypoxie und nach verschiedenen Reoxygenierungszeitpunkten mittels Immunoblot und phosphospezifischer Antikörper bestimmt. Es wurden Kontrollkardiomyozyten die mit Ethanol behandelt wurden, gegen Kardiomyozyten die mit Rosiglitazon behandelt wurden, getestet. Dabei wurde auch die Gesamtproteinexpression von ERK-1 kontrolliert.

Basal gab es keine Unterschiede in der Phosphorylierung von ERK-1 und ERK-2 zwischen den mit Rosiglitazon behandelten Kardiomyozyten und der Kontrollgruppe. Auch die hypoxiebedingte Dephosphorylierung von ERK-1 und ERK-2 war in beiden Gruppen gleich stark ausgeprägt. Die reoxygenierungsbedingte Rephosphorylierung von ERK-1 und ERK-2 war ausgeprägter als bei der Proteinkinase Akt. Der maximale Effekt war dabei auch nach 5 min erreicht. In beiden Gruppen stieg diese auf das Acht- bis Zehnfache des basalen Wertes an, ohne dass ein signifikanter Unterschied zwischen den mit Rosiglitazon behandelten und den unbehandelten Kardiomyozyten bestand. Die ERK Gesamtproteinexpression blieb dabei konstant. (Abbildung 4.9.)

Es konnte gezeigt werden, dass der antiapoptotische Effekt von Rosiglitazon auf Kardiomyozyten bei Hypoxie/Reoxygenierung nicht auf eine veränderte ERK-1/2 Phosphorylierung zurückzuführen ist.

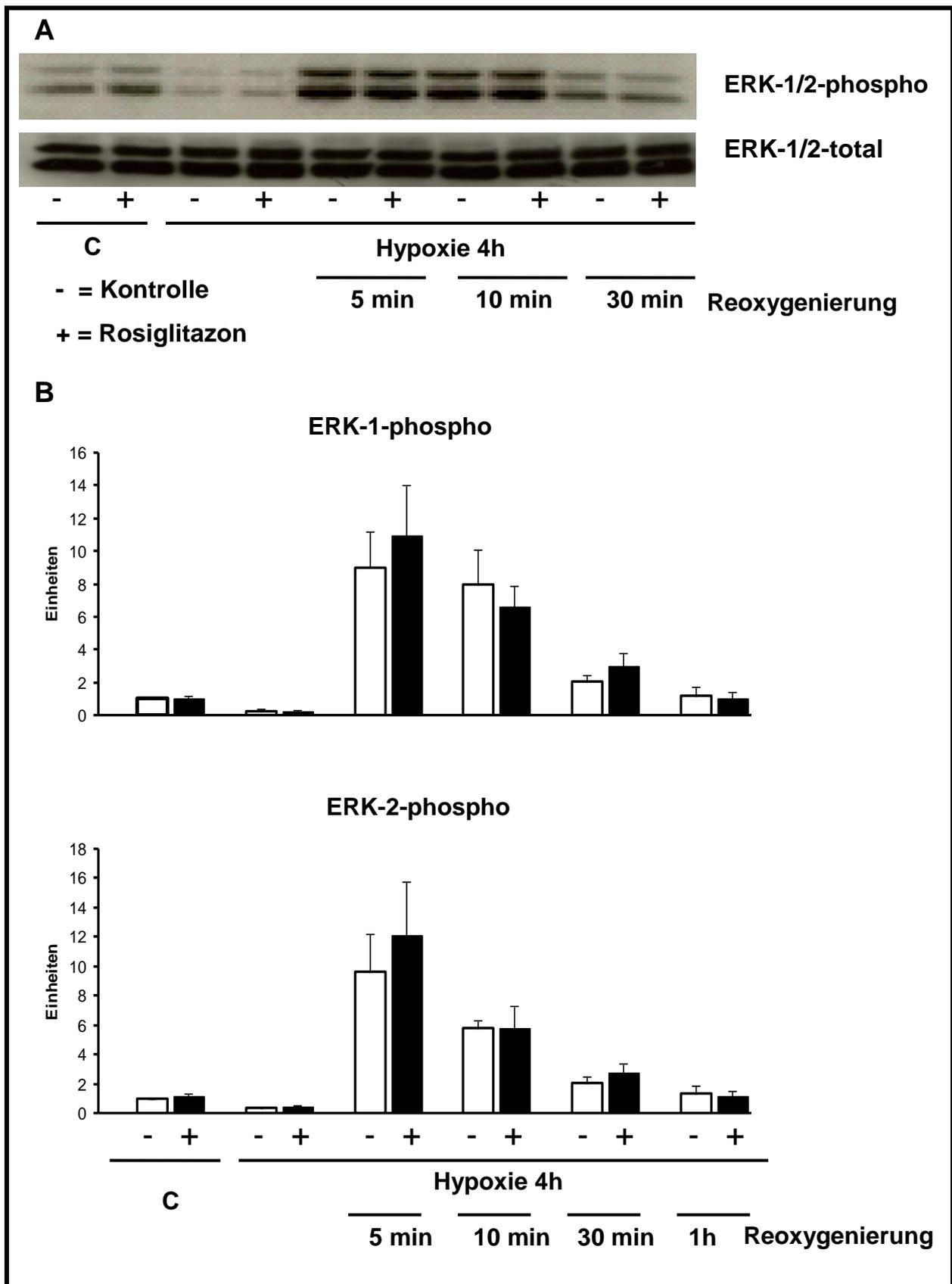


Abb. 4.9.: A: Repräsentativer Immunoblot 5 unabhängiger Experimente der Phosphorylierung der MAPK ERK-1/2. B: Mittelwert \pm SEM 5 unabhängiger Experimente. Die reoxygenierungsbedingte Rephosphorylierung von ERK1/2 war in isolierten Kardiomyozyten in Präsenz von Rosiglitazon ($10\mu\text{mol/l}$) nicht verstärkt.

Neben der MAPK-ERK 1/2 wird in Kardiomyozyten bei der Reoxygenierung auch die MAPK JNK aktiviert. Es gibt Hinweise, dass JNK Apoptose in Kardiomyozyten unter verschiedenen Bedingungen induzieren oder inhibieren kann (Kaiser RA et al 2005; Shao Z et al 2006). Um die Aktivität dieser MAPK zu untersuchen, wurde die Phosphorylierung JNK-1/2 unter basalen Bedingungen, sowie nach 4h Hypoxie und nach verschiedenen Reoxygenierungszeitpunkten mittels Immunoblot mit einem spezifischen Phosphoantikörper bestimmt. Es wurden Kardiomyozyten in Gegenwart von Ethanol als Kontrollzellen gegen Kardiomyozyten, die mit Rosiglitazon nach dem bereits beschriebenen Protokoll stimuliert wurden, untersucht.

Bei JNK-1/2 war unter basalen Bedingungen und nach 4h Hypoxie in beiden Gruppen keine eindeutige Phosphorylierung festzustellen (Abb. 4.10.). Während der Reoxygenierung wurde JNK in den Kardiomyozyten phosphoryliert. Dieser Effekt war über den untersuchten Zeitraum von 30 min anhaltend und unabhängig von der Gegenwart von Rosiglitazon. (Abbildung 4.10.)

Es konnte gezeigt werden, dass der antiapoptotische Effekt von Rosiglitazon auf Kardiomyozyten bei der Reoxygenierung nicht auf eine veränderte Phosphorylierung von JNK-1/2 zurückzuführen ist.

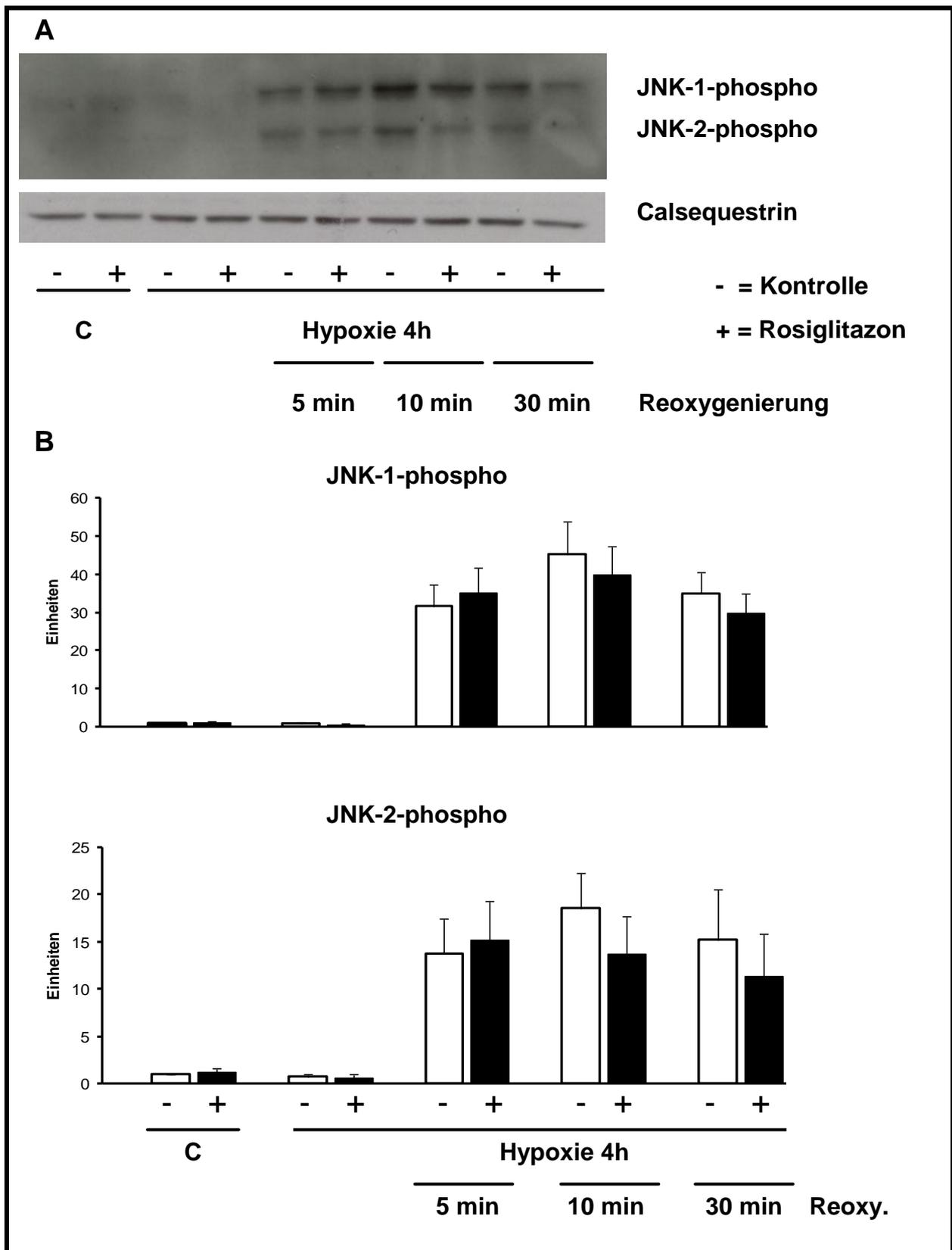


Abb. 4.10.: A: Repräsentativer Immunoblot von 3 unabhängigen Experimenten für die Phosphorylierung von JNK-1/2. B: Mittelwerte \pm SEM: Die Phosphorylierung bei der Reoxygenierung von JNK-1/2 war unabhängig von der Gegenwart von Rosiglitazon ($10 \mu\text{mol/l}$).

4.3.3. Untersuchung der Regulation der Phosphatase PTEN durch Rosiglitazon bei Hypoxie/ Reoxygenierung in isolierten Kardiomyozyten

Bei der Regulation der Proteinkinase Akt spielt die Phosphatase PTEN eine entscheidende Rolle. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Suppression der Expression von PTEN ein wichtiger Prozess in der durch PPAR γ regulierten Glukoseaufnahme in Adipozyten und Myozyten ist (Kim KY et al, 2007). Diese wird über diesen Mechanismus erhöht. Um zu überprüfen, ob der Effekt von Rosiglitazon auf die Phosphorylierung von Akt bei der Reoxygenierung über eine Suppression der Expression von PTEN reguliert wird, wurde unter basalen Bedingungen, sowie nach 4h Hypoxie und nach verschiedenen Reoxygenierungszeitpunkten mittels Immunoblot und spezifischer Antikörper die Expression von PTEN bestimmt. Es wurden Kontrollzellen, die mit Ethanol stimuliert wurden, gegen mit Rosiglitazon stimulierte Kardiomyozyten getestet.

Die Expression von PTEN wurde nicht durch Rosiglitazon reguliert. Es waren keine Unterschiede in der Expression von PTEN, weder basal, noch nach 4h Hypoxie oder während der Reoxygenierung, zwischen der Kontrollgruppe und der Rosiglitazongruppe festzustellen. (Abbildung 4.11.)

Es konnte gezeigt werden, dass die verstärkte Phosphorylierung der Proteinkinase Akt bei der Reoxygenierung von Kardiomyozyten durch Rosiglitazon nicht durch eine verminderte Expression von PTEN bedingt ist.

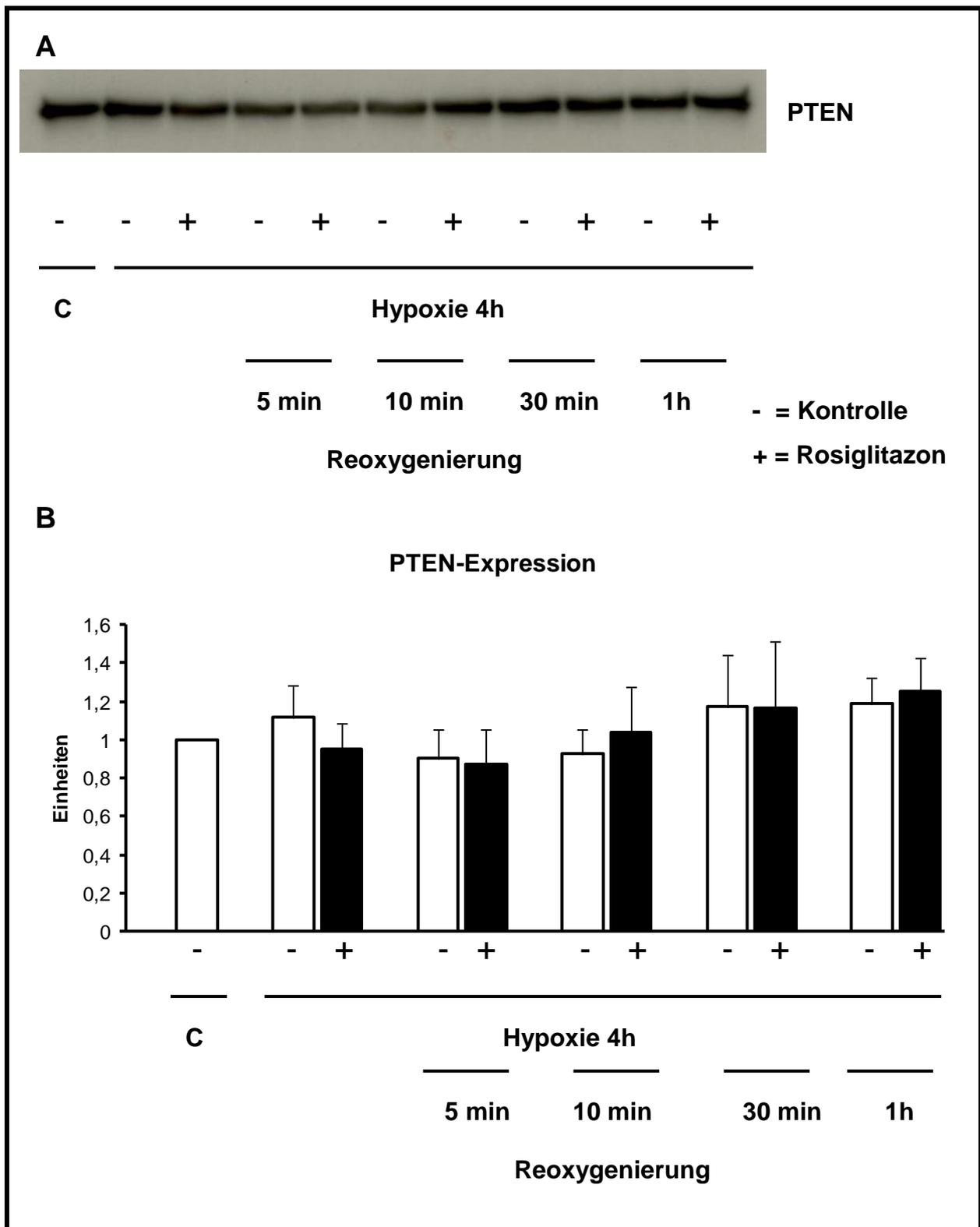


Abb. 4.11.: A: Repräsentativer Immunoblot von 3 unabhängigen Experimenten für die Expression von PTEN. B: Mittelwert +/- SEM für die Expression von PTEN aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Expression von PTEN wurde in isolierten Kardiomyozyten bei Hypoxie/Reoxygenierung nicht durch Rosiglitazon (10µmol/l) reguliert.

5. Diskussion

5.1. Die Erhöhung der Expression des PPAR γ -abhängigen Zielgens CPT-1 durch Rosiglitazon in Kardiomyozyten

In den vergangenen Jahren konnten für PPAR γ -Agonisten protektive kardiovaskuläre Effekte gezeigt werden. Die Effekte wurden größtenteils auf antiinflammatorische Eigenschaften zurückgeführt (Abdelrahman M et al, 2005). Yue TI TL et al (2001) erklärten die reduzierte Myokardinfarktgröße bei Ratten unter Rosiglitazonbehandlung durch eine verringerte Akkumulation von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, eine verringerte Expression von interzellulärem Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und „monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1). Yao YJ et al (2009) zeigten eine Rosiglitazon-bedingte Reduktion des oxydativen Stresses und der Apoptose in Kardiomyozyten von Ratten. Weiterhin konnten Wayman NS et al. (2002) belegen, dass die Aktivierung von NF-kappaB, einem wichtigen Transkriptionsfaktor bei Entzündungsprozessen, unter der Behandlung mit PPAR γ -Agonisten im ischämischen und reperfundierten Myokard verringert war.

Während die Reduktion der Myokardinfarktgröße in vivo unter der Behandlung mit PPAR γ -Agonisten über systemische Effekte erklärt wurde, sind bei Myokardhypertrophie auch direkte Effekte von PPAR γ -Agonisten auf Kardiomyozyten beschrieben. Dabei blieb die Bedeutung des PPAR γ -Rezeptors und der PPAR γ -Agonisten in adulten Kardiomyozyten bei Hypertrophie allerdings unklar. Eine Arbeit von Duan SZ et al (2005) zeigte, dass in vivo ein PPAR γ -knock out in Mäusen zu einer mit dem Alter zunehmenden myokardialen Hypertrophie führt, aber andererseits eine längerfristige Rosiglitazonbehandlung (10mg/kgKG/d für 4 Wochen), auch eine ventrikuläre Hypertrophie induzieren kann. In vitro beschrieben Bao Y et al. (2008) antihypertrophe Effekte bei PPAR γ -Überexpression in isolierten Kardiomyozyten. Es ist jedoch nicht gezeigt worden, ob diese Effekte direkt über eine Aktivierung von PPAR γ oder z.B. pleiotrop, also PPAR γ -unabhängig sind.

In dieser Arbeit haben wir zunächst untersucht, ob PPAR γ -Agonisten direkt in Kardiomyozyten wirken und konnten zeigen, dass eine 24-stündige

Rosiglitazonstimulation die Expression des PPAR γ -Zielgens CPT-1 um 70% in isolierten Kardiomyozyten erhöhte. Diese Gene werden zwar nur schwach in Kardiomyozyten exprimiert und haben bei Ischämie/Reperfusion keine bekannte Bedeutung, dennoch legen diese Ergebnisse nahe, dass PPAR γ -Agonisten Effekte in Kardiomyozyten über eine Bindung am PPAR γ -Rezeptor vermitteln. Demzufolge sind protektive Effekte von PPAR γ -Agonisten bei Ischämie/Reperfusion nicht nur über systemische Effekte erklärbar, sondern auch über direkte Wirkung an Kardiomyozyten möglich.

5.2. Antiapoptotische Effekte des PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon bei Hypoxie/Reoxygenierung

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass der PPAR γ -Agonist Rosiglitazon die Apoptose in isolierten Kardiomyozyten bei der Reoxygenierung reduziert. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass Rosiglitazon direkt protektiv in Kardiomyozyten bei Hypoxie/Reoxygenierung wirkt.

Basal war kein Unterschied bezüglich der Apoptose zwischen den mit Rosiglitazon behandelten und den mit dem Lösungsmittel behandelten Kardiomyozyten zu sehen. Rosiglitazon scheint bei Normoxie demnach keine toxischen Effekte auf Kardiomyozyten zu haben. Dies ist insofern interessant, als dass PPAR γ -Agonisten bei Herzinsuffizienz die Symptome, wie z.B. periphere Ödembildung, verstärken. Dies scheint demnach nicht auf kardiotoxische Effekte, sondern auf andere Effekte, wie eine erhöhte renale Natriumresorption zurückzuführen zu sein (Guan Y et al. 2005).

In vivo Untersuchungen an Nagetieren zeigten, dass Rosiglitazon die Myokardinfarktgröße reduziert. In der schon oben erwähnten Arbeit von Yue TI TL et al (2001) konnte gezeigt werden, dass bei Ratten unter der Vorbehandlung mit Rosiglitazon (1 mg/kg iv bzw. 3 mg/kg iv) nach 30 min Ischämie und 24 h Reperfusion die Myokardinfarktgröße signifikant um 30, bzw. 37% reduziert war. Zhang XJ et al (2009) zeigten ebenfalls in vivo an Ratten, dass eine 14-tägige Vorbehandlung mit Rosiglitazon das Verhältnis zwischen der effektiven Infarktgröße und dem ischämischen Areal, das Auftreten von anhaltenden ventrikulären Fibrillationen, sowie die kardiale Apoptose nach 30 min Ischämie und 2 h Reperfusion, reduziert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Rosiglitazon die Hypoxie induzierte Apoptose nicht reduziert. Nach 4h Hypoxie war die Apoptose der Kardiomyozyten signifikant verstärkt, es war jedoch kein Unterschied in den mit Rosiglitazon behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen festzustellen.

Wir konnten aber zeigen, dass der PPAR γ -Agonist Rosiglitazon den reoxygenierungsbedingten Anstieg der Apoptose in isolierten Kardiomyozyten komplett inhibierte und damit den Reperfusionsschaden reduzieren könnte. Rosiglitazon scheint somit vor allem während der Reoxygenierung günstige Effekte in Kardiomyozyten zu haben und weniger bei der Hypoxie selbst. Dies wurde vorher noch nicht gezeigt. Yao YJ et al. (2009) zeigten in vitro in einer zeitgleichen Publikation, dass eine 12h Vorbehandlung mit Rosiglitazon in isolierten Kardiomyozyten aus Ratten bei Hypoxie/Reoxygenierung die Apoptose dosisabhängig reduziert. Die Apoptose wurde, im Gegensatz zu dieser Arbeit, allerdings nicht zu den unterschiedlichen Zeitpunkten Hypoxie und Reoxygenierung untersucht, sondern nur nach dem Gesamtergebnis Hypoxie/Reoxygenierung. Somit konnte nicht genau differenziert werden, wann der günstige Effekt von PPAR γ -Agonisten auf Kardiomyozyten auftritt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen zusätzlich darauf schließen, dass die Reduktion der Myokardinfarktgröße in den oben genannten in vivo Arbeiten, nicht ausschließlich durch systemische Effekte erfolgte, sondern auch durch direkte protektive Effekte von Rosiglitazon auf Kardiomyozyten bedingt sein könnte. Möglicherweise war das verringerte Vorkommen von Leukozyten und Macrophagen im Infarktareal unter Rosiglitazonbehandlung in der Arbeit von Yue TI TL et al. (2001) nur sekundär, durch eine direkte Verringerung der Apoptose, bedingt.

In einigen experimentellen Protokollen wurde der PPAR γ -Agonist eine oder zwei Wochen vor dem ischämischen Ereignis verabreicht (Yue TI TL et al, 2001; Zhang XJ, 2009). Es ist jedoch eine Applikation unmittelbar vor der Reoxygenierung, was klinisch sehr interessant wäre, denkbar. In dieser, als auch in anderen Arbeiten, verhinderte Rosiglitazon auch nach kurzfristiger Administration (bis zu 30 min vor

dem ischämischen Ereignis) Apoptose in Kardiomyozyten bei Hypoxie/Reoxygenierung (Yue TL et al, 2009).

Diese Ergebnisse könnten klinisch relevant sein, da Patienten mit akutem Myokardinfarkt, zum Zeitpunkt des Ischämiebeginns meist unbehandelt sind und die medikamentöse Therapie bei Eintreffen der medizinischen Erstversorger und nach der koronaren Rekanalisation stattfindet.

5.3. Mechanismus des antiapoptotischen Effektes von Rosiglitazon

Es ist bekannt und gut belegt, dass die Aktivierung der Proteinkinase Akt bei Ischämie/Reperfusion in Kardiomyozyten einen wichtigen antiapoptotischen Mechanismus darstellt. Die Proteinkinase Akt ist nicht nur ein wichtiger Regulator des postnatalen kardiomyozytären Wachstums, sondern auch einer der wichtigsten antiapoptotisch wirkenden Proteine in Kardiomyozyten bei Hypoxie/Reoxygenierung (Shioi T et al, 2002; Rota M et al, 2005). Matsui T et al (2001) zeigten, dass bei Überexpression einer konstitutiv aktiven Proteinkinase Akt die Myokardinfarktgröße in einem Ischämie-Reperusionsmodell bei Ratten um 64% und die Anzahl apoptotischer Zellen um 84% geringer war. In der vorliegenden Arbeit regulierte Rosiglitazon weder basal, noch nach 4h Hypoxie die Phosphorylierung der Proteinkinase Akt. Unter diesen Bedingungen gab es auch keine unterschiedlichen Apoptoseraten zwischen den mit dem Lösungsmittel behandelten Zellen und den mit Rosiglitazon behandelten Kardiomyozyten. In den mit Rosiglitazon behandelten Kardiomyozyten war nur die reoxygenierungsbedingte Rephosphorylierung von Akt signifikant verstärkt und auch die reoxygenierungsbedingte Apoptose war in diesen Kardiomyozyten inhibiert. Dieser Zusammenhang zeigt einen möglichen Mechanismus auf, über den der antiapoptotische Effekt von Rosiglitazon während der Reoxygenierung vermittelt werden kann.

Die Rephosphorylierung von Akt ist nur in den ersten 10 Minuten der Reoxygenierung in den mit Rosiglitazon behandelten Zellen signifikant erhöht. Nach 30-minütiger Reoxygenierung fiel diese wieder auf das Niveau der nicht behandelten Zellen ab. Die transiente Erhöhung der Akt Phosphorylierung in den ersten 10 Minuten der Reoxygenierung scheint ausreichend zu sein, um den antiapoptotischen Effekt zu vermitteln. Hausenloy DJ et al (2005) konnten sogar zeigen, dass die

Rephosphorylierung von Akt in den ersten Minuten der Reperfusion den entscheidenden antiapoptotischen Effekt vermittelt. In der Arbeit war die Phosphorylierung der Proteinkinase Akt durch ischämisches Präkonditionieren in den ersten 15 Minuten der Reperfusion um den Faktor 4 verstärkt. Dabei war die Myokardinfarktgröße in Ratten signifikant reduziert. Wurde die PI3K durch einen Inhibitor blockiert, kam es zu keiner Aktivierung von Akt und zu keiner Reduktion der Infarktgröße.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden durch die einer ähnlichen, ebenfalls zeitgleich publizierten Arbeit unterstützt. So konnten Zhang XJ et al (2009) zeigen, dass die reduzierte Myokardinfarktgröße bei Ischämie/Reoxgenierung bei mit Rosiglitazon vorbehandelten Ratten auf eine Aktivierung der PI3K und der Proteinkinase Akt zurückzuführen ist. Eine Vorbehandlung mit Wortmannin, einem PI3-K Inhibitor, 10 Minuten vor der Reperfusion schwächte den kardioprotektiven Effekt einer 14-tägigen Rosiglitazonbehandlung um 90% ab.

Durch IGF-1 kommt es zu einer ausgeprägten Akt Phosphorylierung. Die IGF-1 bedingte Akt-Phosphorylierung war nicht durch Rosiglitazon verstärkt, weder unter basalen Bedingungen, noch nach 4h Hypoxie. Dies zeigt, dass Rosiglitazon bedingungsabhängig die Phosphorylierung von Akt verstärkt und keinen direkten Rezeptor-Tyrosinkinase-abhängigen Effekt auf die Phosphorylierung von Akt hat. Dieses Ergebnis ist sehr interessant, da eine konstitutiv verstärkte Akt-Aktivität auch negative Effekte, wie eine verstärkte myokardiale Hypertrophie, haben könnte.

Da der Effekt von Rosiglitazon auf die Akt Phosphorylierung durch den PPAR γ -Inhibitor GW 9662 inhibiert wird, scheint dieser Mechanismus abhängig vom PPAR γ -Rezeptor und nicht rezeptor-unabhängig, also pleiotrop, zu sein.

Die Kinase GSK-3 β wird u.a. durch Akt inaktiviert. Barillas R et al (2007) konnten zeigen, dass deren Inaktivierung die Toleranz von hypertrophierten Kardiomyozyten gegenüber Hypoxie verbessert. Akt phosphoryliert GSK-3 β an der Serine 9 Phosphorylierungsstelle und inaktiviert GSK-3 β über diesen Mechanismus. Es konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung von Akt zu einer erhöhten Aktivität von GSK-3 β und damit zu einer erhöhten Apoptoserate in diesen Zellen führt, während die Expression einer dominant negativen Mutante von GSK-3 β zu einer

Inhibierung der Apoptose führt (Pap M et al, 1998). Analog zu Akt war in dieser Arbeit die Phosphorylierung von GSK-3 β in den ersten 10 Minuten der Reoxygenierung signifikant in den mit dem PPAR γ -Agonisten behandelten Kardiomyozyten, erhöht. Auch wenn GSK-3 β nicht nur durch die Proteinkinase Akt reguliert wird, zeigt diese Kaskade doch einen möglichen Mechanismus auf, über den der antiapoptotische Effekt von Rosiglitazon in Kardiomyozyten vermittelt werden kann, nämlich über eine Aktivierung der Proteinkinase Akt, die ihrerseits zu einer Inaktivierung der Kinase GSK-3 β führt. Diese Ergebnisse werden auch durch die zeitgleich erschienene Arbeit von Zhang XJ et al (2009) unterstützt, die zeigten, dass die kardioprotektiven Effekte von Rosiglitazon in vivo vermutlich auf eine Aktivierung der Proteinkinase Akt und eine Inaktivierung der Kinase GSK-3 β zurückzuführen sind.

Die Aktivierung der MAPK ERK reduziert ebenfalls Apoptose in Kardiomyozyten bei Ischämie/Reperfusion. Hausenloy DJ et al (2005) konnten zeigen, dass die gemeinsame Aktivierung der Proteinkinase Akt und der MAPK ERK während der Reperfusion nötig ist, um die Myokardinfarktgröße zu reduzieren, das heißt beide Signaltransduktionswege müssen aktiv sein. Wenn entweder die Aktivität der Proteinkinase Akt indirekt durch einen PI3K Inhibitor oder die der MAPK ERK durch einen MEK-1/2 Inhibitor gehemmt waren, war die Myokardinfarktgröße nicht reduziert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Rosiglitazon die Aktivität der MAP Kinase ERK-1/2 während der Reoxygenierung nicht reguliert, während Akt verstärkt rephosphoryliert wird. Diese Ergebnisse stehen nicht im Widerspruch zueinander, da es unter der Behandlung von Rosiglitazon zu keiner Inhibierung der MAPK ERK kam und somit die Grundaktivität von ERK während der Reoxygenierung erhalten blieb. Dies bedeutet also, dass eine alleinige Verstärkung der Akt-Aktivität ausreichend zu sein scheint, um die reoxygenierungsbedingte Apoptose zu inhibieren.

Die Phosphorylierung der MAPK JNK wurde ebenfalls nicht durch die Behandlung mit Rosiglitazon bei Hypoxie/Reoxygenierung reguliert. Dabei ist die Rolle der MAPK JNK bei kardialer Apoptose nicht endgültig geklärt. Khandoudi N et al (2002) erklärten die verbesserte postischämische linksventrikuläre Funktion in vivo unter Rosiglitazon, die anhand von Messungen des aortalen Flusses, des kardialen Auswurfes, der Herzfrequenz und des Schlagvolumens bestimmt wurde, bei diabetischen und nicht diabetischen Ratten durch eine Inhibierung der

postischämischen JNK-Phosphorylierung/Aktivierung, die zu einer Inhibierung des DNA-bindenden und Apoptose generierenden activating protein-1 führte. Dieser Mechanismus konnte im Versuchsmodell in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Hier war die Phosphorylierung von JNK für beide Gruppen (Kontrolle/Rosiglitazon) sowohl basal als auch bei Hypoxie oder Reoxygenierung gleich. Möglicherweise sind die unterschiedlichen Effekte durch die unterschiedlichen Versuchsmodelle erklärbar. In der vorliegenden Arbeit wurden Effekte in vitro untersucht, während Khandoudi et al. Proteinisolat aus infarzierten Herzen gewannen. Ebenfalls charakterisierten Khandoudi et al. mehr die funktionellen Aspekte, als die Apoptose, die nur indirekt nachgewiesen wurde. Shao Z et al (2006), die die Apoptose direkt untersuchten, konnten zeigen, dass JNK auch protektive Effekte bei Hypoxie/Reoxygenierung haben kann. Sie berichteten sowohl in vivo als auch in vitro dass, eine Aktivierung von JNK in Kardiomyozyten eine Reaktivierung von Akt bewirkt und somit kardiale Apoptose inhibieren kann. Die Autoren konnten auch eine bisher noch nicht beschriebene Bindungsstelle von JNK im Akt-Protein nachweisen. In der vorliegenden Arbeit wurde die verstärkte Akt Rephosphorylierung nicht über JNK reguliert. Wahrscheinlich erfolgt die Reaktivierung von Akt unter Rosiglitazon und die JNK-getriggerte Akt Aktivierung bei Hypoxie/Reoxygenierung über verschiedene Signaltransduktionswege. JNK wurde durch den hypoxischen Stress in dieser Untersuchung auch nicht vermehrt phosphoryliert. Die Phosphorylierung trat erst bei der Reoxygenierung auf. Möglicherweise waren die hier verwendeten experimentellen Bedingungen nicht geeignet um die Phosphorylierung von JNK insbesondere bei Hypoxie zu untersuchen.

Die Inhibierung des Reoxygenierungsschadens von Rosiglitazon an isolierten Kardiomyozyten scheint somit v.a. über die PI3K-abhängigen Kinasen Akt und GSK3 β vermittelt zu sein und nicht über eine Regulation der MAPK ERK und JNK.

Die Suppression von PTEN stellt einen möglichen Mechanismus dar, über den die Phosphorylierung von Akt reguliert sein könnte. Kim KY et al (2007) konnten zeigen, dass die PPAR γ vermittelte Suppression von PTEN einen insulinsensibilisierenden Mechanismus in Adipozyten und Myozyten darstellt, durch den die Glukoseaufnahme gesteigert wird. PTEN ist auch in

Kardiomyozyten an der Inhibition der PI3K-Akt Signaltransduktion von wesentlicher Bedeutung. So konnten Keyes KT et al (2010) zeigen, dass eine pharmakologische Inhibition von PTEN u.a. über eine erhöhte Akt Aktivität die Myokardinfarktgröße reduziert und die linksventrikuläre Funktion in Ratten verbessert. Da PTEN also u.a. durch PPAR γ reguliert werden kann und in Kardiomyozyten von Bedeutung ist, wurde in dieser Arbeit überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der PTEN-Expression und der verstärkten reoxygenierungsbedingten Akt Phosphorylierung durch Rosiglitazon besteht. Im Gegensatz zu den Adipozyten und Myozyten ist die Expression von PTEN in Kardiomyozyten nicht durch Rosiglitazon reguliert und somit nicht für die Rosiglitazon-vermittelte Akt-Regulation verantwortlich. Der genaue Regulationsmechanismus der verstärkten Rephosphorylierung von Akt bleibt somit offen und ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

5.4. Zusammenfassung und mögliche klinische Bedeutung

Diese Arbeit konnte zeigen, dass der PPAR γ -Agonist Rosiglitazon direkt auf Kardiomyozyten wirkt und hier bei Hypoxie/Reoxygenierung einen signifikanten antiapoptotischen Effekt vermittelt und v.a. den reoxygenierungsbedingten Schaden inhibiert. Dieser Effekt wird vermutlich PPAR γ -abhängig über die Proteinkinase Akt und die Kinase GSK-3 β vermittelt. Deren frühe Rephosphorylierung bei Reoxygenierung wird durch Rosiglitazon signifikant verstärkt. Die MAPKinasen ERK-1/2 und JNK-1/2 werden nicht durch Rosiglitazon bei Hypoxie oder Reoxygenierung reguliert. Die verstärkte Rephosphorylierung von Akt wird nicht über die Phosphatase PTEN vermittelt.

Während der kardioprotektive Effekt von PPAR γ -Agonisten bei Ischämie/Reperfusion bei Nagetieren in unabhängigen tierexperimentellen Studien gezeigt werden konnte, ist die Bedeutung bei Säugetieren noch unklar. In einer Arbeit, in der Schweine 8 Wochen oral mit Troglitazon, Rosiglitazon, Alpha-Tocopherol oder Placebo vorbehandelt wurden und anschließend einer 90-minütigen myokardialen Ischämie sowie 90-minütigen Reperfusion unterzogen wurden, konnte nur für Troglitazon und Alpha-Tocopherol eine reduzierte Myokardinfarktgröße und eine verbesserte linksventrikuläre Funktion gezeigt werden. Rosiglitazon verbesserte die linksventrikuläre Funktion nicht und führte zu keiner Reduktion der Myokardinfarktgröße. Die Autoren erklären dies über die zusätzliche Alpha-Tocopherol Komponente des Troglitazons und nahmen an, dass die alleinige PPAR γ -aktivierende Wirkung von Rosiglitazon in Säugetieren keine kardiomyozytäre Apoptose verhindert (Xu Y et al, 2005). Spezies- und Substanzunterschiede innerhalb der Thiazolidindione bezüglich des kardioprotektiven Effekts sind somit nicht ausgeschlossen.

Die PROactive-Studie, eine prospektive randomisierte und doppelblinde Studie, die die Effekte des PPAR γ -Agonisten Pioglitazon auf makrovaskuläre Ereignisse untersuchte, zeigte für Pioglitazon eine Reduktion der nicht-fatalen Myokardinfarkte bei Diabetikern (Charbonnel B et al, 2004). Nissen SE et al. vermuten 2007 in einer Meta-Analyse, dass bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 eine Behandlung mit Rosiglitazon das Myokardinfarktrisiko im Vergleich zu anderen antidiabetischen Medikamenten erhöht, allerdings ohne signifikanten Anstieg der Mortalität. Die

unveränderte Mortalität bei meta-analytisch gezeigter höherer Ereignisrate, könnte ein Hinweis auf einen protektiven Effekt einer PPAR γ -Aktivierung bei einem Myokardinfarkt sein. In der RECORD-Studie, einer prospektiven, doppelblinden und randomisierten multizentrischen Nicht-Unterlegenheitsstudie, in der die Mortalität und Hospitalisierung von Patienten, mit einer Kombination von Metformin und Sulfonylharnstoffen gegen die von Patienten die zusätzlich Rosiglitazon einnahmen, verglichen wurde, konnten die Daten von Nissen allerdings nicht bestätigt werden. Hier zeigte sich keine erhöhte Myokardinfarktrate oder erhöhte kardiovaskuläre Sterblichkeit, allerdings vermehrt Symptome einer Herzinsuffizienz (Home PD et al, 2009). Trotz dieser vermehrten Herzinsuffizienzsymptome, scheint Rosiglitazon keine kardiotoxischen Eigenschaften zu haben. Dies kann vermutet werden, da in dieser Arbeit in den mit Rosiglitazon behandelten Kardiomyozyten keine erhöhte Apoptoserate zu beobachten war. Die vermehrten Symptome einer Herzinsuffizienz, wie z.B. Beinödeme sind somit am ehesten auf eine erhöhte Natriumabsorption durch Rosiglitazon im renalen Sammelrohr zurückzuführen und nicht auf eine myokardiale Schädigung (Guan Y et al, 2005). Die endgültige Bedeutung der PPAR γ -Agonisten im Menschen, insbesondere bei Ischämie/Reperfusion, ist allerdings noch nicht geklärt.

Auch wenn der Versuchsaufbau und der Zelltyp bei allen in vitro Experimenten Einschränkungen hinsichtlich der Aussagekraft und der globalen Ergebnisse im Gesamtorganismus mit sich bringen, unterstützt diese Arbeit in Zusammenschau mit der vorliegenden Literatur doch eine intensivere Prüfung weiterer klinischer Anwendungsmöglichkeiten von PPAR γ -Agonisten. Vor allem vor dem Hintergrund, dass der Reperfusionsschaden ein noch ungelöstes klinisches Problem darstellt, stellt sich die Frage, ob die klinische Prüfung einer Aktivierung des PPAR γ -Rezeptors unmittelbar während des ischämischen kardialen Ereignisses, noch vor der Reperfusion ein sinnvolles, neues Therapiekonzept darstellen könnte, um den Reperfusionsschaden zu vermindern. Eine Aktivierung des PPAR γ -Rezeptors unmittelbar vor einer koronaren Rekanalisierung bei einem Myokardinfarkt oder mit der kardioplegen Lösung bei Operationen an der Herz-Lungenmaschine könnten den Reperfusionsschaden verringern und somit die Inzidenz einer Herzinsuffizienz oder zumindest deren Schweregrad verringern.

6. Literaturverzeichnis

1. Abdelrahman M, Sivarajah A, Thiemermann C. Beneficial effects of PPAR-gamma ligands in ischemia-reperfusion injury, inflammation and shock. *Cardiovasc Res.* 2005 Mar 1;65(4):772-81. Review
2. Bao Y, Li R, Jiang J, Cai B, Gao J, Le K, Zhang F, Chen S, Liu P. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits endothelin-1-induced cardiac hypertrophy via the calcineurin/NFAT signaling pathway. *Mol Cell Biochem.* 2008 Oct;317(1-2):189-96.
3. Barac A, Campia U, Matuskey LA, Lu L, Panza JA. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation with pioglitazone on plasma adipokines in nondiabetic patients with either hypercholesterolemia or hypertension. *Am J Cardiol.* 2008 Apr 1;101(7):980-5.
4. Barillas R, Friehs I, Cao-Danh H, Martinez JF, del Nido PJ. Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta improves tolerance to ischemia in hypertrophied hearts. *Ann Thorac Surg.* 2007 Jul;84(1):126-33.
5. Becker RC, Meade TW, Berger PB, Ezekowitz M, O'Connor CM, Vorchheimer DA, Guyatt GH, Mark DB, Harrington RA The primary and secondary prevention of coronary artery disease: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition).; American College of Chest Physicians. *Chest.* 2008 Jun;133(6 Suppl):776S-814S.
6. Bellacosa, A., Testa, J.R., Staal, S.P., and Tsichlis, P.N. (1991) A retroviral oncogen, akt, encoding a serine-Threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254, 274-277
7. Bighetti EJ, Patrício PR, Casquero AC, Berti JA, Oliveira HC. Ciprofibrate increases cholesteryl ester transfer protein gene expression and the indirect reverse cholesterol transport to the liver. *Lipids Health Dis.* 2009 Nov 23;8:50.

8. Bolli, R., Jeroudi, M., Patel, B., Aruoma, O., Halliwell, B., Lai, E. & McCay, P. Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion: evidence that myocardial stunning is a manifestation of reperfusion injury. *Circ. Res.* 1989 Sep;65(3):607-22.
9. Cao Z, Ye P, Long C, Chen K, Li X, Wang H. Effect of pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, on ischemia-reperfusion injury in rats. *Pharmacology.* 2007;79(3):184-92.
10. Cavender MA, Alexander KP, Broderick S, Shaw LK, McCants CB, Kempf J, Ohman EM. Long-term morbidity and mortality among medically managed patients with angina and multivessel coronary artery disease. *Am Heart J.* 2009 Dec;158(6):933-40.
11. Charbonnel B, Dormandy J, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Skene A, and PROactive Study Group. The Prospective Pioglitazone Clinical Trial in Macrovascular Events (PROactive). *Diabetes Care* July 2004 vol. 27 no. 7 1647-1653
12. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000 Mar 1;35(3):569-82. Review.
13. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell.* 1997 Oct 17;91(2):231-41.
14. Desvergne, B., Wahli, W., Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* 20 (1999) 649 – 688
15. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Strömberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K, Vahanian A, Camm J, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hellemans I,

- Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano JL, Tendera M, Auricchio A, Bax J, Böhm M, Corrà U, della Bella P, Elliott PM, Follath F, Gheorghide M, Hasin Y, Hernborg A, Jaarsma T, Komajda M, Kornowski R, Piepoli M, Prendergast B, Tavazzi L, Vachieri JL, Verheugt FW, Zamorano JL, Zannad F. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). European Society of Cardiology; Heart Failure Association of the ESC (HFA); European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), *Eur J Heart Fail.* 2008 Oct;10(10):933-89. Review. No abstract available. Erratum in: *Eur J Heart Fail.* 2009 Jan;11(1):110.
16. Diéguez C, Fruhbeck G, López M. Hypothalamic Lipids and the Regulation of Energy Homeostasis. *Obes Facts.* 2009;2(2):126-135
 17. Duan SZ, Ivashchenko CY, Russell MW, Milstone DS, Mortensen RM. Cardiomyocyte-specific knockout and agonist of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma both induce cardiac hypertrophy in mice. *Circ Res.* 2005 Aug 19;97(4):372-9.
 18. Duan SZ, Ivashchenko CY, Russell MW, Milstone DS, Mortensen RM. Cardiomyocyte-specific knockout and agonist of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma both induce cardiac hypertrophy in mice. *Circ Res.* 2005 Aug 19;97(4):372-9.
 19. Fajas, L., Debril, M. B., Auwerx, J., PPAR gamma: an essential role in metabolic control. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 11 (2001) 64 – 69.
 20. Feldman LJ, Himbert D, Juliard JM, Karrillon GJ, Benamer H, Aubry P, Boudvillain O, Seknadji P, Faraggi M, Steg G. Reperfusion syndrome: relationship of coronary blood flow reserve to left ventricular function and infarct size. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 35: 1162–1169.

21. Fenske D und Husmann M, Pharmazeutische Zeitung, Glitazone: PPAR-Rezeptoren vermitteln vielfältige Effekte; 2003-23.
22. Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. Interaction of Cardiovascular Risk Factors with Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury, Preconditioning, and Postconditioning. *Pharmacol Rev.* 2008 Mar 4.
23. Gensch C, Clever YP, Werner C, Hanhoun M, Böhm M, Laufs U. The PPAR-gamma agonist pioglitazone increases neoangiogenesis and prevents apoptosis of endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis.* 2007 May;192(1):67-74.
24. Guan Y, Hao C, Cha DR, Rao R, Lu W, Kohan DE, Magnuson MA, Redha R, Zhang Y, Breyer MD. Thiazolidinediones expand body fluid volume through PPARgamma stimulation of ENaC-mediated renal salt absorption. *Nat Med.* 2005 Aug;11(8):861-6.
25. Haffner SM, Greenberg AS, Weston WM, Chen H, Williams K, Freed MI. Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation.* 2002 Aug 6;106(6):679-84.
26. Hausenloy DJ and Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the reperfusion injury salvage kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 61: 448–460, 2004.
27. Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, Yellon DM. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Feb;288(2):H971-6.
28. Hausenloy DJ, Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev.* 2007 Dec;12(3-4):217-34. Review.
29. Home PD, Pocock SJ, Beck-Nielsen H, Curtis PS, Gomis R, Hanefeld M, Jones NP, Komajda M, McMurray JJ. Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes

- (RECORD): a multicentre, randomised, open-label trial.; RECORD Study Team. *Lancet*. 2009 Jun 20;373(9681):2125-35.
30. Honda HM and Ping P. 2006. Mitochondrial permeability transition in cardiac cell injury and death. *Cardiovascular Drugs and Therapy* Volume 20, Issue 6, Pages 425–432
 31. Hori H, Sasaoka T, Ishihara H, Wada T, Murakami S, Ishiki M, Kobayashi M. Association of SH2-containing inositol phosphatase 2 with the insulin resistance of diabetic db/db mice. *Diabetes*. 2002 Aug;51(8):2387-94.
 32. Horwich TB, Fonarow GC. Glucose, obesity, metabolic syndrome, and diabetes relevance to incidence of heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Jan 26; 55(4):283-93.
 33. Kaiser RA, Liang Q, Bueno O, Huang Y, Lackey T, Klevitsky R, Hewett TE, Molkentin JD. Genetic inhibition or activation of JNK1/2 protects the myocardium from ischemia-reperfusion-induced cell death in vivo. *J Biol Chem*. 2005 Sep 23;280(38):32602-8.
 34. Keller, H., et al., Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2160 - 2164.
 35. Keyes KT, Xu J, Long B, Zhang C, Hu Z, Ye Y. Pharmacological inhibition of PTEN limits myocardial infarct size and improves left ventricular function post-infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Jan 22.
 36. Khandoudi N, Delerive P, Berrebi-Bertrand I, Buckingham RE, Staels B, Bril A. Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, inhibits the Jun NH(2)-terminal kinase/activating protein 1 pathway and protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Diabetes*. 2002 May;51(5):1507-14.
 37. Kim KY, Cho HS, Jung WH, Kim SS, Cheon HG. Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 suppression is an important process in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma signaling in adipocytes and myotubes. *Mol Pharmacol*. 2007 Jun;71(6):1554-62.

38. Klouche K, Weil MH, Sun S, Tang W, Povoas HP, Kamohara T, Bisera J. Evolution of the stone heart after prolonged cardiac arrest. *Chest*. 2002 Sep;122(3): 1006-11
39. Komajda M, Curtis P, Hanefeld M, Beck-Nielsen H, Pocock SJ, Zambanini A, Jones NP, Gomis R, Home PD; RECORD Study Group. Effect of the addition of rosiglitazone to metformin or sulfonylureas versus metformin/sulfonylurea combination therapy on ambulatory blood pressure in people with type 2 diabetes: a randomized controlled trial (the RECORD study). *Cardiovasc Diabetol*. 2008 Apr 24;7:10.
40. Latruffe, N., Vamecq, J., Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) as regulators of lipid metabolism. *Biochimie* 79 (1997) 81 - 94.
41. Levitsky S. Protecting the myocardial cell during coronary revascularization. The William W. L. Glenn Lecture.. *Circulation*. 2006 Jul 4;114(1 Suppl):I339-43.
42. Liang P, Jiang B, Huang X, Xiao W, Zhang P, Yang X, Long J, Xiao X, Huang X. Anti-apoptotic role of EGF in HaCaT keratinocytes via a PPARbeta-dependent mechanism. *Wound Repair Regen*. 2008 Sep-Oct;16(5):691-8.
43. Lim HJ, Lee S, Park JH, Lee KS, Choi HE, Chung KS, Lee HH, Park HY. PPAR delta agonist L-165041 inhibits rat vascular smooth muscle cell proliferation and migration via inhibition of cell cycle. *Atherosclerosis*. 2009 Feb;202(2):446-54. Epub 2008 May 21.
44. Linz W, Wohlfart P, Baader M, Breitschopf K, Falk E, Schäfer HL, Gerl M, Kramer W, Rütten H. The peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR-alpha) agonist, AVE8134, attenuates the progression of heart failure and increases survival in rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2009 Jul;30(7):935-46
45. Matsui T, Li L, del Monte F, Fukui Y, Franke TF, Hajjar RJ, Rosenzweig A. Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes in vitro. *Circulation*. 1999 Dec 7;100(23):2373-9.

46. Matsui T, Nagoshi T, Rosenzweig A. Akt and PI 3-kinase signaling in cardiomyocyte hypertrophy and survival. *Cell Cycle*. 2003 May-Jun;2(3):220-3. Review.
47. Matsui T, Rosenzweig A. Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI 3-kinase and Akt. *J Mol Cell Cardiol*. 2005 Jan;38(1):63-71. Review.
48. Matsui T, Tao J, del Monte F, Lee KH, Li L, Picard M, Force TL, Franke TF, Hajjar RJ, Rosenzweig A. Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo. *Circulation*. 2001 Jul 17;104(3):330-5.
49. Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, Vrints CJ. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int J Cardiol*. 2005 Apr 20;100(2):179-90. Review.
50. Narkar VA, Downes M, Yu RT, Embler E, Wang YX, Banayo E, Mihaylova MM, Nelson MC, Zou Y, Juguilon H, Kang H, Shaw RJ, Evans RM. AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. *Cell*. 2008 Aug 8;134(3):405-15.
51. Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med*. 2007 Jun 14;356(24):2457-71. Erratum in: *N Engl J Med*. 2007 Jul 5;357(1):100.
52. Nolte, R.T., et al., Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*, 1998. 395(6698): p. 137-43.
53. Pap M, Cooper GM. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem*. 1998 Aug 7;273(32):19929-32.
54. Piper HM, Meuter K, Schäfer C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg*. 2003 Feb;75(2):S644-8. Review.

55. Rainer Klinke, Hans-Christian Pape, Stefan Silbernagl (Hrsg.): Lehrbuch der Physiologie. 5. Auflage. Thieme, Stuttgart 2005
56. Rota M, Boni A, Urbanek K, Padin-Iruegas ME, Kajstura TJ, Fiore G, Kubo H, Sonnenblick EH, Musso E, Houser SR, Leri A, Sussman MA, Anversa P. Nuclear targeting of Akt enhances ventricular function and myocyte contractility. *Circ Res.* 2005 Dec 9;97(12):1332-41.
57. Shao Z, Bhattacharya K, Hsich E, Park L, Walters B, Germann U, Wang YM, Kyriakis J, Mohanlal R, Kuida K, Namchuk M, Salituro F, Yao YM, Hou WM, Chen X, Aronovitz M, Tsichlis PN, Bhattacharya S, Force T, Kilter H. c-Jun N-terminal kinases mediate reactivation of Akt and cardiomyocyte survival after hypoxic injury in vitro and in vivo. *Circ Res.* 2006 Jan 6;98(1):111-8.
58. Shioi T, McMullen JR, Kang PM, Douglas PS, Obata T, Franke TF, Cantley LC, Izumo S. Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Mol Cell Biol.* 2002 Apr;22(8):2799-809.
59. Steuer J, Granath F, de Faire U, Ekbom A, Ståhle E. Increased risk of heart failure as a consequence of perioperative myocardial injury after coronary artery bypass grafting. *Heart.* 2005 Jun;91(6):754-8.
60. Tang ED, Nuñez G, Barr FG, Guan KL. Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt. *J Biol Chem.* 1999 Jun 11;274(24):16741-6.
61. Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM. PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol.* 1995 Jan;15(1):351-7.
62. Tsukube T, McCully D, Faulk EA, Federman M, LoCicero J, Krukenkamp IB, Levitsky S. Magnesium cardioplegia reduces cytosolic and nuclear calcium and DNA fragmentation in the senescent myocardium. *Ann Thorac Surg.* 1994;58:1005.
63. Van de Werf F, Bax J, Betriu A, Blomstrom-Lundqvist C, Crea F, Falk V, Filippatos G, Fox K, Huber K, Kastrati A, Rosengren A, Steg PG, Tubaro M, Verheugt F, Weidinger F, Weis M; ESC Committee for Practice Guidelines

- (CPG), Vahanian A, Camm J, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hellemans I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano JL, Silber S, Aguirre FV, Al-Attar N, Alegria E, Andreotti F, Benzer W, Breithardt O, Danchin N, Di Mario C, Dudek D, Gulba D, Halvorsen S, Kaufmann P, Kornowski R, Lip GY, Rutten F. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2008 Dec;29(23):2909-45.
64. Wada T, Sasaoka T, Funaki M, Hori H, Murakami S, Ishiki M, Haruta T, Asano T, Ogawa W, Ishihara H, Kobayashi M. Overexpression of SH2-containing inositol phosphatase 2 results in negative regulation of insulin-induced metabolic actions in 3T3-L1 adipocytes via its 5'-phosphatase catalytic activity. *Mol Cell Biol*. 2001 Mar;21(5):1633-46.
65. Wagner DR, Delagardelle C, Ernens I, Rouy D, Vaillant M, Beissel J. Matrix metalloproteinase-9 is a marker of heart failure after acute myocardial infarction. *J Card Fail*. 2006 Feb;12(1):66-72.
66. Wayman NS, Hattori Y, McDonald MC, Mota-Filipe H, Cuzzocrea S, Pisano B, Chatterjee PK, Thiemermann C. Ligands of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-gamma and PPAR-alpha) reduce myocardial infarct size. *FASEB J*. 2002 Jul;16(9):1027-40.
67. Xu Y, Gen M, Lu L, Fox J, Weiss SO, Brown RD, Perlov D, Ahmad H, Zhu P, Greyson C, Long CS, Schwartz GG. PPAR-gamma activation fails to provide myocardial protection in ischemia and reperfusion in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Mar;288(3):H1314-23.
68. Yao YJ, Geng DF, Wang JF, Yang MH, Zhang YL, Nie RQ, Zhou SX. PPAR gamma agonist rosiglitazone alleviates hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress and apoptosis in rat cardiac myocytes. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2009 Apr;29(4):689-93. Chinese.

69. Yue TI TL, Chen J, Bao W, Narayanan PK, Brill A, Jiang W, Lysko PG, Gu JL, Boyce R, Zimmerman DM, Hart TK, Buckingham RE, Ohlstein EH. In vivo myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *Circulation*. 2001 Nov 20;104(21):2588-94.
70. Zhang XJ, Xiong ZB, Tang AL, Ma H, Ma YD, Wu JG, Dong YG. Rosiglitazone-induced myocardial protection against ischaemia/reperfusion injury is mediated through a PI3K/Akt-dependent pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009 Jun 29. [Epub ahead of print]

7. Publikationen/Dank

7.1. Publikationen

Während der vorgelegten Dissertation entstanden folgende Publikationen:

H. Kilter, M. Werner, C. Roggia, M. Boehm (Homburg/Saar DE). The PPAR γ agonist rosiglitazone exerts direct anti-apoptotic effects in hypoxia/reoxygenation (P 433) ESC Heart Failure Meeting Juni 2006 (Helsinki)

M. Werner, C. Roggia, M. Böhm, H. Kilter. Der PPARgamma Agonist Rosiglitazon hat einen direkten protektiven Effekt an isolierten Kardiomyozyten bei Hypoxie/Reoxygenierung. 51. Jahreskongress der SPIG Februar 2007 (Neustadt/Weinstraße)

M. Werner, J.-C. Reil, C. Roggia, H. Kilter (Homburg/Saar). Protektive Effekte des PPARgamma-Agonisten Rosiglitazon bei Hypoxie/Reoxygenierung isolierter Kardiomyozyten. 73. Jahrestagung der DGK April 2007 (Mannheim)

Kilter H, Werner M, Roggia C, Reil JC, Schäfers HJ, Kintscher U, Böhm M. The PPAR-gamma agonist rosiglitazone facilitates Akt rephosphorylation and inhibits apoptosis in cardiomyocytes during hypoxia/reoxygenation. Diabetes Obes Metab. 2009 Nov;11(11):1060-7.

7.2. Danksagungen

Mein Dank gilt Herrn Universitätsprofessor Dr. med. M. Böhm für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, die Dissertationsarbeit in den Laboratorien der Klinik für Innere Medizin III der Universität des Saarlandes erstellen zu können.

Herrn Dr. med. H. Kilter danke ich für die gute wissenschaftliche Betreuung, sowie für seine stetige Unterstützung in allen Abschnitten der Durchführung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Julia Michaely für die Einführung in die Methoden, sowie für die hervorragende technische Unterstützung.

Ebenfalls möchte ich Frau Dr. med. C. Roggia danken. Ohne ihre Hilfe wäre die PCR-Analyse nicht möglich gewesen.

Weiterhin möchte ich allen Doktoranden, technischen Assistenten und Mitarbeitern des Labors für die kollegiale Zusammenarbeit danken.

Für die finanzielle Unterstützung beim Druck dieser Arbeit danke ich dem Fonds National de la Recherche, Luxembourg.

An dieser Stelle möchte ich meiner Mutter Frau Nicole Werner-Scheuren und meinem Bruder Eric Werner ganz besonders danken. „Während der gesamten Arbeit und besonders während manch frustrierenden Augenblicken konnte ich auf eure Unterstützung zählen. Ohne eure Hilfe wäre mein Studium und diese Dissertationsarbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.“

8. Lebenslauf

Persönliche Daten :

Name : Werner
Vorname : Marc
Adresse : 19, rue Tubis
L-2629 Luxemburg
Geburtsort und -datum : Esch/Alzette (Luxemburg), den 3. Mai 1981
Staatsangehörigkeit : Luxemburgisch
Konfession : Katholisch
Eltern : Edmond Werner
Nicole Werner-Scheuren

Schulbildung:

- 1985/86 - 1986/87 : Besuch der Vorschule in Cessange
- 1987/88 - 1992/93 : Besuch der Grundschule in Cessange
- 1993/94 - 1999/2000 : Besuch des Gymnasiums, Lycée Michel Rodange,
in Luxemburg.
- Juli 2000 : Abitur in Luxemburg mit der Gesamtnote "gut"

Studium:

- 2000 – 2001 : Medizinstudium als freier Student am Centre
Universitaire in Luxemburg
- 2001 – 2002 : Medizinstudium am Centre Universitaire in
Luxemburg, Gesamtnote "sehr gut"
- Von 2002/03 – 2007: Medizinstudium an der Universität des Saarlandes,
medizinische Fakultät Homburg/Saar
- 17. September 2003 : Abschluss der ärztlichen Vorprüfung mit der
Gesamtnote "gut"
- August 2006: Internistisches Tertial des Praktischen Jahres in der
I. und III. Klinik für Innere Medizin der Universität
des Saarlandes

- Dezember 2006: Anästhesiologisches Tertial des Praktischen Jahres in der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie der Universität des Saarlandes
- März 2007: Chirurgisches Tertial des Praktischen Jahres in der Herz- und Gefäßchirurgie des Inselspitals in Bern unter Prof. Thierry Carrel.
- 4. Dezember 2007: Abschluss der ärztlichen Prüfung mit der Gesamtnote "gut"
- 10. Dezember 2007: Approbation als Arzt
- Von 2003-2006 : Betreuer des Anatomiepraktikums am anatomischen Institut der Universität des Saarlandes unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Pedro Mestres
- September 2006 : USMLE Step 1 bestanden mit den Punktzahlen 94 bzw 231

Wissenschaft:

- 2004-2007 : Experimentelle Arbeit unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Böhm und Betreuung von Dr. Heiko Kilter an der Klinik für Innere Medizin III der Universität des Saarlandes.

Beruflicher Werdegang:

- März 2008 - Februar 2010: Assistenzarzt in der kardiochirurgischen Funktionsdiagnostik der herzchirurgischen Klinik des HDZ-NRW in Bad Oeynhausen, Universitätsklinik der Ruhr Universität Bochum.
- Seit März 2010: Assistenzarzt in der II. medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz