

1. Einleitung

Herz-Kreislauf- Erkrankungen führen in den Industrieländern seit Jahrzehnten die Todesursachenstatistik. Unter dieser großen Entität nimmt die Herzinsuffizienz eine besondere Bedeutung, denn sie ist der pathophysiologischer Endzustand vieler dieser Erkrankungen. Das Lebenszeitrisko an Herzinsuffizienz zu erkranken liegt momentan bei Männern und Frauen über 40 bei 20% (Lloyd-Jones DM, 2002). Gleichzeitig wird erwartet, dass die Anzahl an Menschen die älter als 60 Jahre sind vom jetzigen 24,1% der Bevölkerung im Jahre 2050 auf 36,7% ansteigen, die Zahl der über 80 jährigen sogar verdreifachen auf 12,1% der Bevölkerung.(Pötzsch O et al 2003) Aufgrund der demographischen Entwicklung und der verbesserten Überlebenschancen durch den medizinischen Fortschritt wird die Herzinsuffizienz eine der größten Herausforderungen der Medizin auch in Zukunft bleiben. Mit der Entwicklung der Pharmakogenomik könnte in der Zukunft sogar eine individualisierte Therapie ermöglicht werden. (Zineh 2006, Goldstein 2003, Roses 2000). Somit ist die Erkundung der pathophysiologischen Mechanismen die zur Herzinsuffizienz führen besonders kritisch.

1.1 Apoptose

Einer dieser Mechanismen, der im Bereich der Kardiologie erst seit kurzem erforscht wird, ist der programmierte Zelltod, bekannt auch als Apoptose. Prof. Kerr und seine Mitarbeiter Wyllie und Curie beobachteten als Erste, dass Zellen in verschiedenen Zelltypen beim Sterben gewisse morphologische Veränderungen in einer bestimmten Abfolge aufwiesen (Kerr 1972). Mikroskopisch kann Apoptose durch ihre charakteristische morphologische Eigenschaften beobachtet werden. (Alberts et. al.). Die betroffene Zelle schrumpft (Pyknose), verliert Kontaktoberfläche und trennt sich so von ihren Nachbarzellen. Der Zytoskelett kollabiert, die Kernmembran wird aufgelöst. Das Chromatin kondensiert an der Peripherie des Nukleus, der Nucleolus desintegriert und der Zellkern wird in internukleosomalen Segmenten fragmentiert (Karyorhexis) mit dem typischen Bild einer „oligonucleosomal ladder“ (Cohen 1994). Am Ende verändert sich die Zellmembran „Blebbing“ und formt sog. „apoptotic bodies“ mit intakten Zellorganellen, die im Anschluß von den angrenzenden Zellen oder von Makrophagen phagozytiert werden. Dadurch werden Schädigungen an den Nachbarzellen, wie bei einer Zell-Lyse bei Nekrose vermieden.

Nach Empfehlung von Prof. Cormack wurde dieses Phänomen (nach dem altgriechischen Wort für das Fallen der Blätter) Apoptose genannt. In vielen Arbeiten seitdem konnte nachgewiesen werden, dass dieser kontrollierte Zelluntergang in vielen Prozessen, wie Embryogenese, Inflammation, im Immunsystem, sowie in Alterungsprozessen eine zentrale Rolle spielt. Dabei handelt es sich um einen entwicklungsbiologisch hochkonservierten Prozess. So führt zum Beispiel eine fehlende Elimination von bösartigen Zellen zu tumorösem Wachstum, von infizierten Zellen zu viraler Persistenz und von autoreaktiven Zellen zu Autoimmunerkrankungen. Störungen der Apoptose-Kaskaden konnten mitverantwortlich gemacht werden für die Pathogenese Epstein-Barr-Virus-assoziiierter Erkrankungen, wie zum Beispiel im Rahmen von nasopharyngealen Tumoren und dem Burkitt-Lymphom.

Auf der anderen Seite kommt es durch eine übermäßige Induktion von Abbauvorgängen zu pathologischen degenerativen Prozessen, wie sie zum Beispiel beim Morbus Alzheimer, der Chorea Huntington und dem Morbus Parkinson nachgewiesen werden konnten (Cotman u. Anderson 1995, Mochizuki et al. 1996, Schapira 1999, Smale et al. 1995). Die Störung der Entwicklung wurde beim Fragilen X-Syndrom oder beim Autismus diskutiert (O'Reilly u. Strasser 1999; Rudin u. Thompson 1997, Thompson 1995)

In einer der ersten Modellen zur Erforschung der Apoptose, im Erdwurm *Caenorhabditis elegans*, konnten 14 Gene identifiziert werden, die eine Rolle beim Zelltod spielen. In diesem Organismus werden 131 Zellen von insgesamt 1090 während der embryonalen Entwicklung eliminiert. (Hengartner, Horvitz 1991). Darunter sind 3 Gene (ced-3, ced-4, ced-9) die in besonderem Masse in der Ausführung und Regulation des Zelltodes beteiligt sind und zwei davon ced-3 und ced-4 sind notwendig zur Elimination aller 131 Zellen (Yuan 1993). Der Gen ced-9 ist ein Antagonist der anderen zwei Gene. In mutierten Zellen mit ced-9-Funktionsverlust konnte gezeigt werden, dass Zellen die überleben sollten auch am programmierten Zelltod sterben, mit letalen Folgen für den Embryo. (Hengartner 1992). Diese Ergebnisse haben eine Reihe von Untersuchungen veranlasst um äquivalente Gene in höhere Lebewesen zu entdecken.

1.2 Grundlagen der Apoptose

1.2.1 Caspasen

Um die vorher genannten morphologischen Veränderungen während der Apoptose zu erreichen sind Proteasen notwendig, genauer gesagt Caspasen. (Alnemri 1996) Diese ced-3 analoge Proteasenfamilie enthält ein Zystein im aktiven Zentrum und spaltet ihre Zielproteine an bestimmten Asparaginsäureresten. Alle diese Proteasen werden als Procaspasen synthetisiert und werden durch Aspartat-gesteuerte Proteolyse aktiviert. Dabei entstehen heterotetramere Enzyme mit jeweils zwei kleine und zwei größere Untereinheiten und zwei aktive Zentren pro Molekül (Reed 2000)(s. Abb 1.2). Aktuell sind 14 Caspasen bekannt, die funktionell in Initiator und Effektor Caspasen aufgeteilt werden (Salvesen 1997). Ferner ist eine Gruppe (Caspase-1, 4, 5, 11, 13) die nicht bei der Apoptose sondern bei der inflammatorischen Immunantwort (Zytokinproduktion wie IL-1 β und IL 18) eine Rolle spielen. Die Initiator Caspasen (Caspase 2, 8, 9, 10) enthalten eine lange Prodomäne mit einem charakteristischen CARD (Caspase Recruiting Domain) wie bei Caspase-2,-9 oder eine DED (Death Effector Domain) wie bei Caspase -8 und -10 (Review Clerk 2003, Ho PK 2005, Lavrik 2005, Wang 2000) (vgl. Abb. 1.1)

Diese Domänen interagieren mit komplementäre Domäne auf Adaptorproteine und aktivieren durch Autoproteolyse die Initiator Caspasen, die wiederum kaskadenartig die Effektor Caspasen (Caspase-3, 6, 7) aktivieren. Gleichzeitig können diese Effektor Caspasen, im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus, weitere Initiator Caspasen aktivieren (Slee 1999) und sind zur Autokatalyse fähig (z.B. Caspase-3 kann procaspase-3 aktivieren) (Zhivotovsky 2003).

Caspase 12, die wie die Initiator Caspasen über eine CARD verfügt nimmt eine Sonderstellung. Sie wird im endoplasmatischen Reticulum lokalisiert und spielt eine Rolle bei Apoptoseinduktion unabhängig von Mitochondrien und Membranproteinen (Nagakawa 2000). Die Bedeutung dieses Apoptoseinduktionsweges für kardiales Gewebe ist zur Zeit völlig ungeklärt. In der jüngeren Literatur wurde Caspase 12 als Pseudogen bei Kaukasiern berichtet und nur in einer Untergruppe Individuen afrikanischer Herkunft mit erhöhtem Risiko einer bakteriellen Sepsis funktionell existent. (Saleh 2004, Kroemer 2005)

Seit wenigen Jahren wird auch über Caspase-unabhängigen programmierten Zelltod berichtet (Reviews Abraham Trends Cell Biol 2004, Broeker Clin Cancer Res 2005, Chipuk NatRevMolCell Biol 2005, Jin CancerBiolTher 2005, Kim J Pathol 2006, Oncology Reports 2005, Kroemer NatMed 2005). Das Thema wird aber an dieser Stelle nicht weiter vertieft.

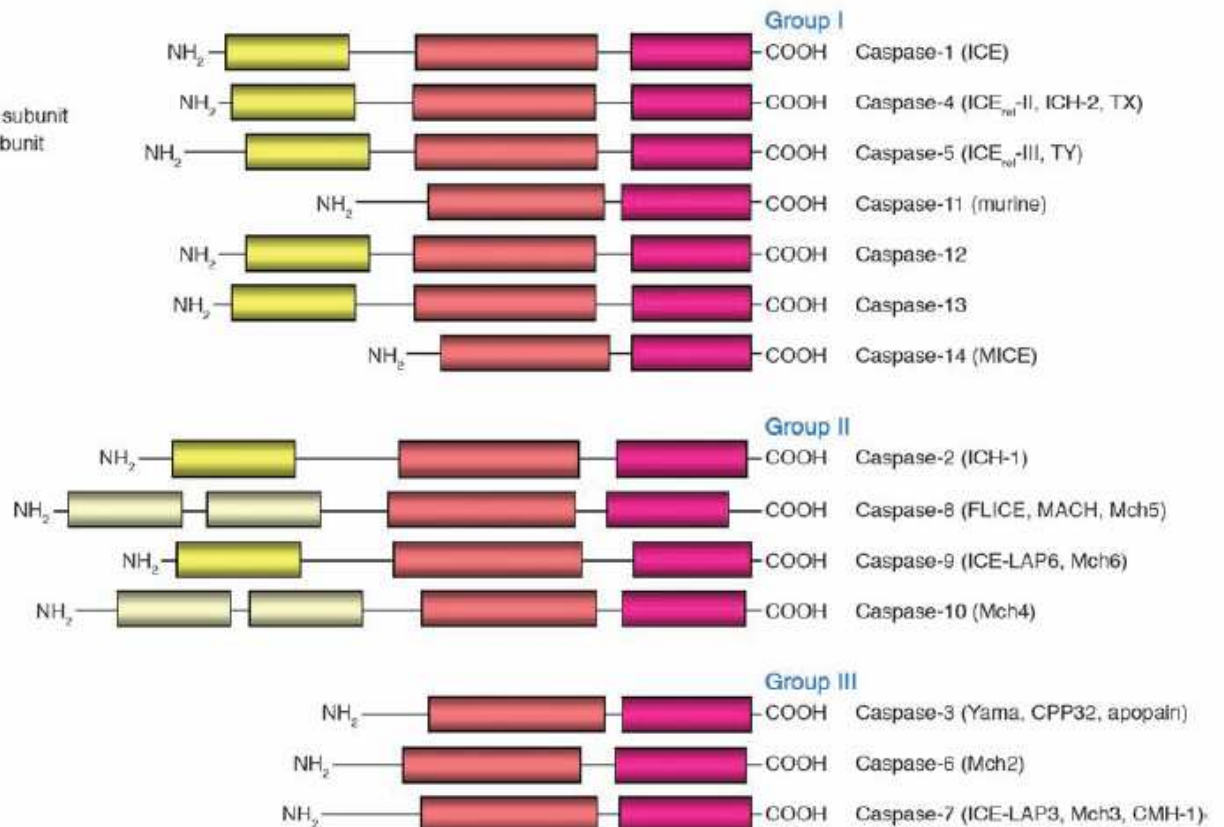


Abb. 1.1 Überblick der Caspasenfamilie. Gruppe I: Inflammatorische Caspasen, Gruppe II: Initiator Caspasen, Gruppe III: Effektor Caspasen (Aus Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005; 115(10): 2665-2672)

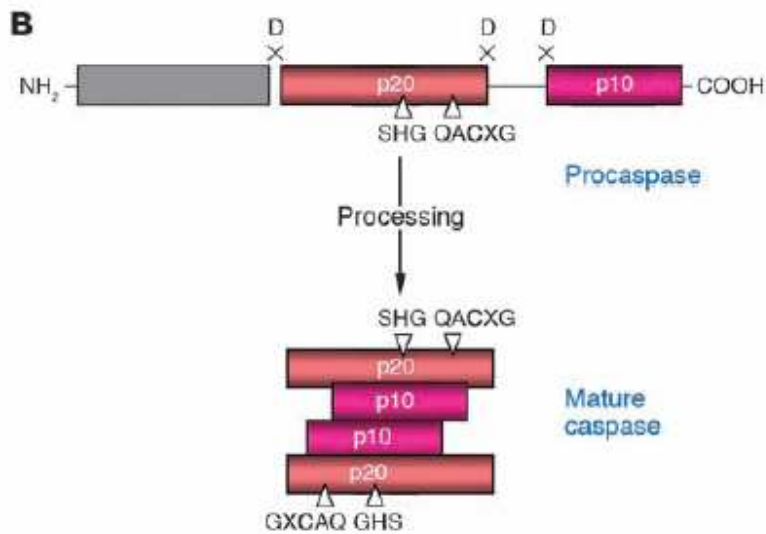


Abb 1.2. Konformationsänderung einer Caspase auf dem Weg von Procaspase zur aktivierten Caspase (Aus Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005; 115(10): 2665-2672)

1.2.2 Caspase Aktivierung

Zur Zeit sind zwei Hauptwege für die Aktivierung der Caspasen bekannt. Einerseits werden sie über einen, durch membranständigen Rezeptoren vermittelten, (extrinsischen) und zum anderen über einen mitochondrial vermittelten (intrinsischen) Weg aktiviert. (vgl. Abb. 1.3). Je nach Apoptoseweg werden unterschiedliche Initiatorcaspasen aktiviert, die aber die gleichen Effektorcaspasen aktivieren. Somit besitzen beide Aktivierungswege eine gemeinsame Endstrecke. Diese Aufteilung ist teilweise aber auch didaktischer Natur, denn in diesem System sind auch mehrere Rückkopplungsmechanismen integriert, und etliche Proteasen und deren Inhibitoren sind in beiden Apoptosewegen beteiligt.

1.2.3 Der extrinsische Aktivierungsweg der Apoptose

Der extrinsische Aktivierungsweg der Apoptose erfolgt über die Aktivierung zellmembranständiger „Todesrezeptoren“. Diese bestehen aus einer Cystein-reichen Region extrazellulär und einer sogenannten „Todesdomäne“ (Death Domain, DD) intrazellulär (Clerk et

al. 2003; Locksley et al. 2001), die für die Weiterleitung des Signals in den Intrazellulärraum bedeutsam ist.

Bis jetzt sind mindestens sieben Todesrezeptoren in der Literatur beschrieben, die sämtlich der TNF- α -Rezeptorfamilie angehören (Baker u. Reddy 1998; Higuchi et al. 2004). Sie haben, je nach Systematik, unterschiedliche Bezeichnungen bekommen. Die fünf bisher am besten charakterisierten Rezeptoren sind TNF-R1 (Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1/p55/CD120a), Fas (APO-1/CD95), DR3 (auch bekannt, als Apo 3), TRAIL-Rezeptor 1 (TNF-related apoptosis inducing ligand-Rezeptor/DR4), TRAIL-Rezeptor 2 (DR5), DR 6 und NGFR (Nerve Growth Factor Rezeptor). Gleichzeitig sind 2 Rezeptoren beschrieben, die ebenfalls die gleichen Liganden binden, aber keine funktionelle zytoplasmatische Domäne aufweisen, daher die Namensgebung Decoy Receptor 1,2 und 3 (Ashkenazi u. Dixit 1999). Bindet ein spezifischer Ligand an drei „Todesrezeptoren“, so bildet sich am zytoplasmatischen Teil des Rezeptors ein trimerer Komplex, der als Bindungsstelle für intrazelluläre Proteine dient.

An den durch FasL (Fas Ligand) aktivierten Fas-Rezeptor bindet intrazellulär die Fas-assoziierte Todesdomäne („Fas-associated-death-domain“, FADD)(Chinnaiyan et al. 1995; Juo et al. 1999). Am N-terminalen Ende der FADD befindet sich eine sogenannte Todeseffektordomäne („Death effector domain“, DED). Diese interagiert mit der DED der Prodomänen von Procaspase-8 bzw. -10 (s. Abb. 1.4). Dieser multimerer Komplex auf der zytoplasmatischen Seite des Rezeptors wird DISC (death inducing signaling complex) genannt (Gupta 2001). Der DISC am aktivierten Todesrezeptor schafft die Voraussetzung für die Aktivierung der Procaspase-8 bzw. -10. Durch die räumliche Nähe der Procaspasen werden auch deren katalytischen Zentren einander angenähert. Vermutlich bewirken zusätzliche sterische Veränderungen eine Aktivierung der Procaspasen, so daß gegenseitige Aktivierung der Caspasen erfolgen kann. Es entsteht eine aktivierte Caspase-8 bzw. -10, die entweder andere Caspasen oder das proapoptotische Bid aus der Bcl-Proteinfamilie aktivieren kann. Mit der Aktivierung der Caspase-3 und anderer Effektorcaspasen wird die gleiche Endstrecke des apoptotischen Zelluntergangs beim intrinsischen Apoptoseweg aktiviert. Dies führt schließlich zur DNA-Fragmentatierung und zum Untergang der Zelle (Green u. Kroemer 1998; Green u. Reed 1998).

Ähnlich zum Fas-Rezeptor wirkt Bindung des Liganden TNF- α an TNF-R1 auch im Sinne einer proapoptischen Aktivierung, dieses mal durch die intrazelluläre Assoziation mit einem weiteren Adapterprotein, TRADD („TNF-R1-associated-DD“) (Ashkenazi u. Dixit 1998). Über diese Bindung kommt es dann ebenfalls zu einer FADD-Aktivierung und in deren Folge ebenfalls zu einer Aktivierung der Caspase-8 (s. Abb 1.4).

Der Weg, der über die Aktivierung von Todesrezeptoren schließlich zur Apoptose führt, kann durch eine Anzahl von Proteinen reguliert werden, so zum Beispiel durch cFLIP („cellular Fas-associated Protein with DD-like interleukin-1 β -converting enzyme or caspase-8 inhibitory protein“) (Tschopp u. Irmeler 1998). cFLIP konkurriert mit Caspase-8 um die Bindungsstelle an FADD, jedoch ohne eine eigene katalytische Aktivität zu besitzen, so dass die Kaskade durch kompetitive Interaktion unterbrochen wird (s. Abb.1.3).

Im Falle der Rezeptoren für TNF- α und TRAIL/DR4 können an die N-terminale Region von TRADD außer dem proapoptischen Adapterprotein FADD (Kuang et al. 2000) auch andere Proteine gebunden werden, wie zum Beispiel TRAF2 (TNF-R-assoziiertes-Faktor 2) oder RIP1 (Rezeptor-interagierendes-Protein 1). RIP1 und TRAF2 aktivieren NIK (nuclear factor κ B-inducing kinase), was schließlich zu einer erhöhten Aktivität des Transkriptionsfaktors NF κ B führt, der in den meisten untersuchten Zelltypen eine antiapoptische Wirkung aufweist.

Auch der Fas-Rezeptor kann alternative Signaltransduktionswege aktivieren. So ist es möglich, dass bei einer Rezeptoraktivierung auch sogenannte JNKs („Jun amino kinase“) aktiviert werden, die zur Familie der MAP-Kinasen (Mitogen aktivierte Proteinkinasen) gehören (Gulbins et al. 1996). Diese spielen bei der Induktion proliferativer und „remodeling“-Genen eine Rolle, dienen aber auch zur Verstärkung des apoptotischen Signals. Ihre Rolle in der Apoptose wird noch kontrovers diskutiert. Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist die p38-MAP-Kinase. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass zur Aktivierung von JNKs und p38-MAP-Kinasen ein Adapterprotein (Daxx) benötigt wird, das an FADD bindet und daraufhin ASK („apoptosis-signaling kinase“) aktiviert, die ihrerseits dann JNKs und p38-MAP-Kinasen aktiviert (Yang et al. 1997).

Die Signaltransduktion ist somit abhängig von zahlreichen Modulationen und letztlich von der Balance zwischen aktivierenden und hemmenden Signalen.

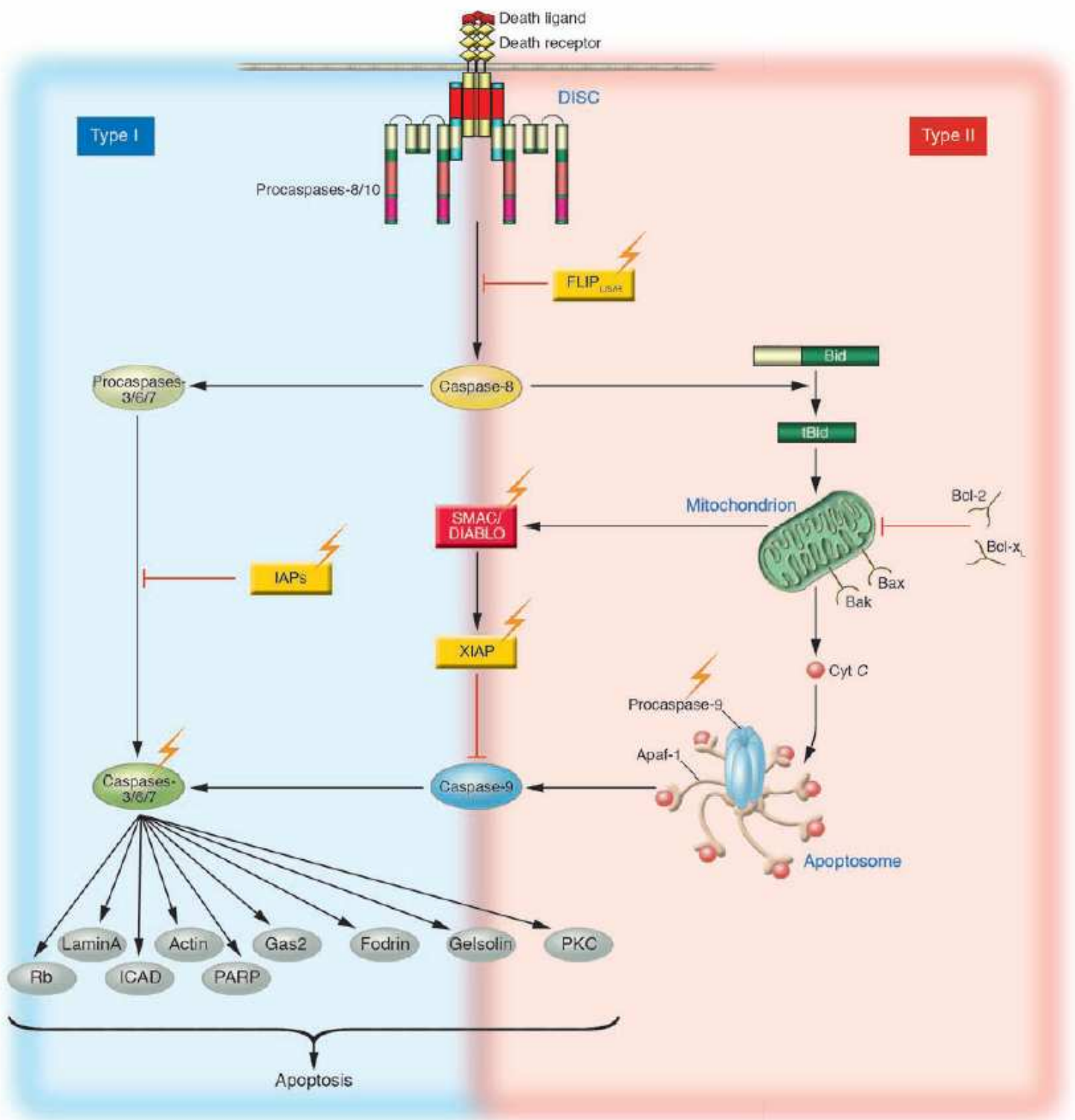


Abb 1.3. Schematische Darstellung des intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweges. (Aus Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005; 115(10): 2665-2672)

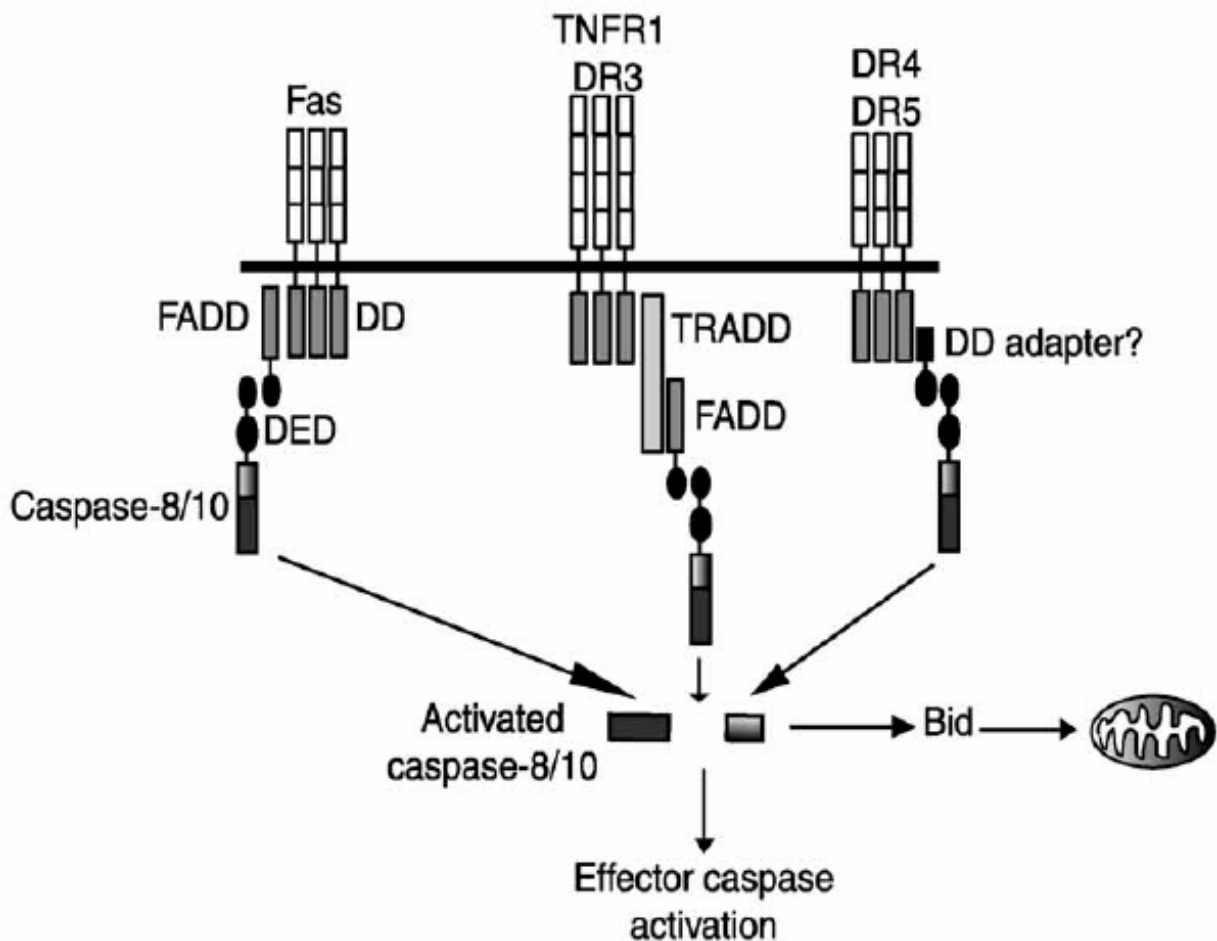


Abb 1.4 Aktivierung der Initiator Caspasen über den extrinsischen Apoptoseweg. An den Todesdomänen (DD) von einem Komplex aus jeweils drei Rezeptoren haften Adaptermoleküle, die eine Todeseffektordomäne (DED) besitzen und bilden ein DISC. Diese wiederum interagieren mit den DED der Initiatorcaspasen und aktivieren sie (Aus Clerk et al. Pharma&Therap 2003)

Dass der Signalweg über die Todesrezeptoren essentiell auch für die embryonale Entwicklung von Bedeutung ist, zeigen Versuche an genetisch veränderten Mäusen. FADD-Knockout-Mäuse, genauso wie Caspase-8-, Knockouts', sterben in der Embryonalphase an schweren Herzschäden (Yeh et al. 1998; Varfolomeev et al. 1998). Im Gegensatz dazu überleben Mäuse mit einer Deletion der Rezeptoren Fas und TNFR1, was möglicherweise für das Vorhandensein anderer Rezeptoren spricht, die in diesen Signalweg eingebunden sind (Adachi et al. 1996). Alternativ konnten Todesrezeptoren redundante Funktionen während der Entwicklung aufweisen.

1.2.4 Der intrinsische Aktivierungsweg der Apoptose

Die Initiierung der intrinsischen Kaskade erfolgt über die Mitochondrien. Ausschlaggebend für die Aktivierung ist die Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran. So kann zum Beispiel die aktivierte Caspase-8, Bid (ein Mitglied der Bcl-2-Proteinfamilie) aktivieren. (s. Abb. 1.3) Das aktivierte Protein transloziert vom Zytosol auf die mitochondriale Außenmembran und formt Komplexe mit Bcl-2 und Bcl-xL. Diese antipoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie wirken normalerweise im Mitochondrion membranstabilisierend. Sie liegen dort als Komplex mit Bax und Bak vor. Durch die neue Bindung mit dem aktivierten Bid, werden Bax und Bak frei, können oligomerisieren und bilden einen Kanal an der mitochondrialen Außenmembran. (Antonsson B et. al 2000 u. 2001)(s. Abb. 1.5) Dadurch kommt zur Freisetzung von Proteinen, wie Cytochrom c, Apoptose-induzierendem Faktor (AIF) und DIABLO/smac aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytosol. (Reviews Adrain et.al 2003, Clerk et.al. 2003, Kroemer&Martin 2005). Daraufhin wird der Apoptosom-Komplex formiert, welches dann die zentrale Effektor Caspase 3 katalysiert und setzt die Caspase Kaskade in Gange. Diese sog. Caspase Kaskade ist der gemeinsame Endpunkt vom intrinsischen und extrinsischen Weg. Am Ende dieser Kaskade kommt es u. a. zur Aktivierung von PARP und Fragmentierung der DNA an den internukleosomalen Regionen. (s. Abb 1.3)

1.2.5 Die Bcl-2 Proteinfamilie: Regulatoren der mitochondrialen Aktivierung

Wie vorher erwähnt ist Bid nur ein Mitglied der Bcl-2-Proteinfamilie. Dabei handelt es sich um eine hochkonservierte Proteinfamilie, deren Homologe in Säugetiere, Vögeln, Fische aber auch bei Invertebraten wie den *C. elegans* und *Drosophila* zu finden sind.

Bcl-2 war ursprünglich als Onkogen (B-cell lymphoma 2) identifiziert. Später wurde seine onkogenetische Eigenschaft seiner antiapoptotischen Effekten zugesprochen. Zurzeit sind beim Menschen 20 Mitglieder dieser Familie beschrieben und sie sind sowohl Membranassoziiert, als auch im Zytoplasma nachweisbar. (Hockenbery et al. 1990). Einer überwiegend proapoptotisch wirkenden Untergruppe dieser Familie, wie beispielsweise Bax, Bad, Bid, Bim, Bmf steht eine Untergruppe mit antiapoptotischen Eigenschaften gegenüber. Letztere bewirkt eine effektive

Suppression der intrinsischen Aktivierungskaskade (Bcl-2, Bcl-xL). Als Gemeinsamkeit besitzen sie in ihren Exonen eine oder mehrere Bcl-2 Homologiedomänen (BH1-4). Dabei soll nur BH 4 mit antiapoptotischen Eigenschaften vergesellschaftet sein.

Eine Reihe von kurzen Vertretern dieser Familie wie Bid, Bad, Bim, Noxa, Puma enthalten nur eine BH3 Domäne „BH3-only proteins“. Sie sind im Zytosol lokalisiert und fungieren dort als Sensoren für zytosolische Stressfaktoren (Adams and Cory 2001). Die Aktivierung von Bid über Caspase-8 wurde schon beschrieben (Kap. 1.2.4).

Über den gleichen Mechanismus mit Formierung von Bax/Bak Kanäle und Freisetzung von Cytochrom c von dem intermitochondrialen Raum (s. Abb 1.6) fungieren auch die andere „BH-3-only“ Proteinen, die aber auf andere Stressfaktoren ansprechen. So können ionisierende Strahlen, Chemotherapeutika oder Zytokinenzug, die Bim, Bad oder Noxa aktivieren. (Erlacher M et al 2005, Kuwana T et. al. 2005) Puma und Noxa werden über das durch DNA-Schäden aktivierte p53 reguliert. (Chipuk et al 2005, Oda et. al. 2000).

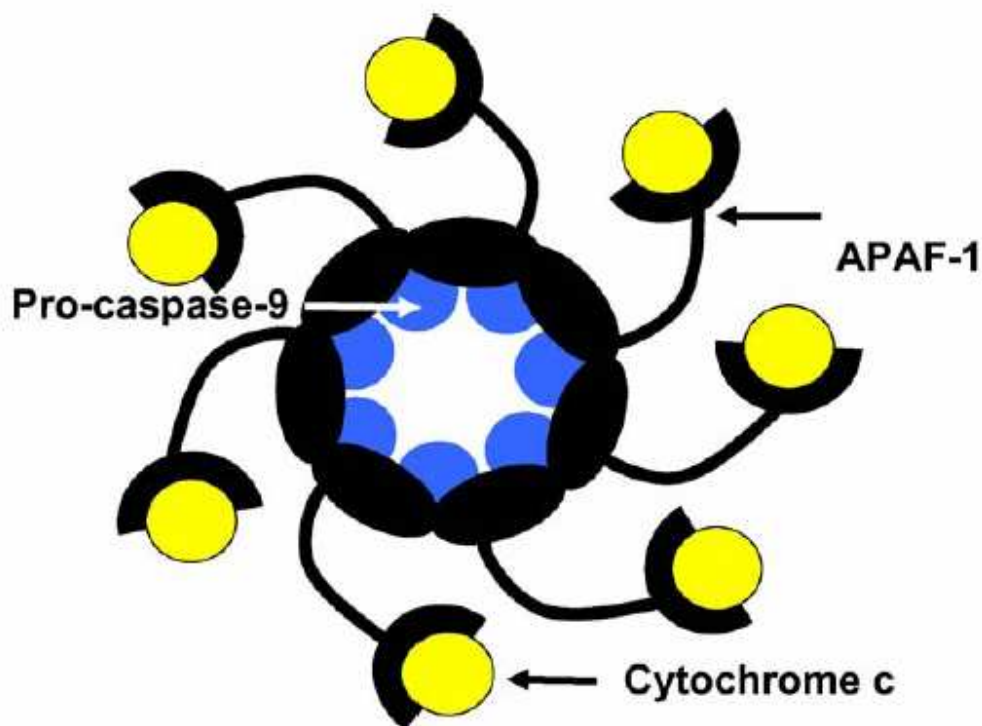


Abb 1.5 Das Apoptosom (aus Regula und Kirshenbaum 2005)

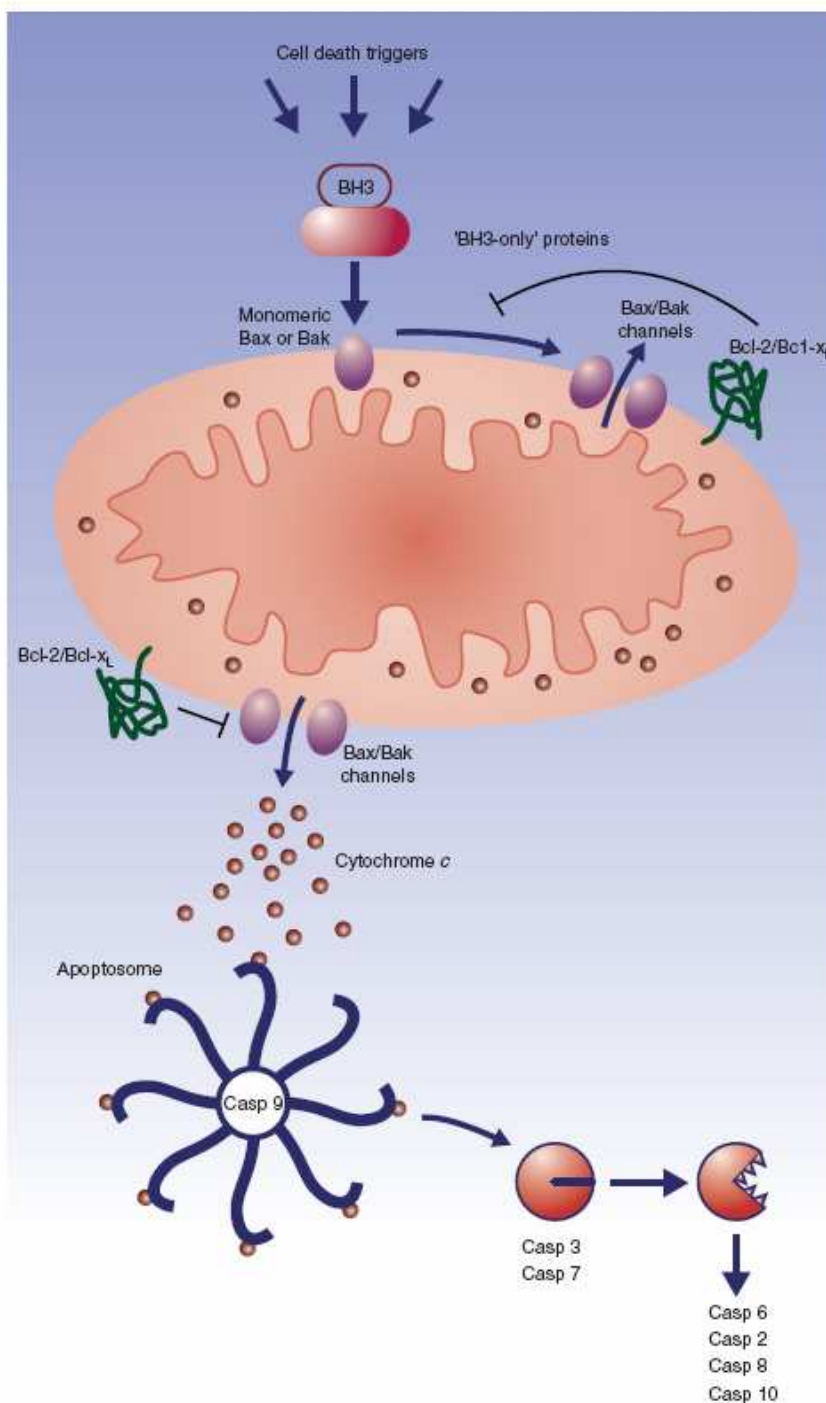


Abb. 1.6 Unterschiedliche Stressfaktoren wie DNA-Brüche, ionisierende Strahlung, Chemotherapeutika etc., führen zu Aktivierung von Bcl-2 Proteine die nur eine BH3 Domäne besitzen. (BH3-only Proteins) Die aktivierte Proteine translokieren vom Zytosol an der mitochondriale Aussenmembran und bewirken, dass Bax und Bak miteinander Kanäle formieren, die die Cytochrom c Freisetzung ermöglichen. (Aus Adrain et. al. 2003)

1.2.6 Cytochrom c und Apoptoseaktivierung. Formierung des Apoptosomes

Cytochrom c bildet mit dem Adapterprotein Apaf-1 („apoptotic protease-activating factor 1“) und der inaktiven Proform der Caspase-9 einen Komplex, in dem zunächst die Caspase-9 aktiviert wird. (s. Abb. 1.5) Dies führt wiederum zur Aktivierung der Exekutivcaspase-3 (Li et al. 1997).

1.3 Kardiale Apoptose und die Rolle der IAPs

Eine strikte Kontrolle der Apoptose bei den Kardiomyozyten, die während des gesamten Lebens des Organismus funktionieren müssen erscheint besonders sinnvoll. Auch wenn das Modell vom terminal differenziertem Gewebe der Herzmuskelzellen in letzter Zeit angefochten wird (Anversa 2000, 2002, 2006), sind die Kardiomyozyten postmitotische Zellen mit einer eingeschränkten regenerativen Fähigkeit. Apoptose konnte in einer Reihe von kardialen Erkrankungen nachgewiesen werden wie bei Hypoxie im Ischämie/Reperfusion Modell (de Moissac 2000, Freude et al. 2000, Scarabelli et al 2001) in atheromatöse Läsionen (Isner et al 1995) und apoptotisch bedingter Zelluntergang ist ein signifikanter Faktor in der Entstehung der Herzinsuffizienz (Reviews Gill et al. 2002; Clerk et al. 2003, Foo et al. 2005, Garg et al. 2005).

Die kritische Rolle der Apoptose in der Entstehung der Herzinsuffizienz konnte in einer Reihe von Studien experimentell gezeigt werden (Guerra, et al. 1999, Hein et al. 2003, Narula et al. 1996, Olivetti et al. 1997, Saraste et. al. 1999, Wencker et al. 2003). In einem transgenen Mausmodell mit Kardiomyozyten-spezifische Überexpression der Procaspase 8 konnte gezeigt werden, dass selbst ein sehr niedriges Niveau an kardialer Apoptose (80-250 Kardiomyozyten pro 10^5 Nuklei) in der Lage war, eine Dilatationskardiomyopathie mit Todesfolge zu erzeugen. (Wencker et al 2003). Durch Caspaseinhibition konnte dieser Phänotyp verhindert werden. Eine kontinuierliche subkutane Gabe eines Caspaseninhibitors verbesserte die Entwicklung einer Herzinsuffizienz und führte zu einer signifikanten Überlebensratenerhöhung im *Gαq* transgene Mausmodell peripartaler Kardiomyopathie. (Hayakawa Y et. al 2003)

Ferner spielt die Apoptose auch bei nichtmyokardialen Herzzellen eine bedeutende Rolle bei der Progression der Herzinsuffizienz (Takemura et al 1998). Im postinfarziellen Granulationsgewebe konnte gezeigt werden, dass die Apoptoseinhibition nichtmyokardialer Herzmuskelzellen zu

einem verbesserten linksventrikulären Remodeling und zur Verbesserung der linksventrikulären Funktion führen kann (Hayakawa K et al 2003).

Somit scheint die Aktivierung einer proapoptotischen Signalkaskade ein wichtiger Faktor bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz zu sein und eine weitere Erforschung der antiapoptotischen Mechanismen birgt ein hohes Potenzial für neue Therapieansätze.

Ein zentrales Bestandteil der antiapoptotischen Regulationsmaschinerie sind die IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) (Reviews in Green 2001, Goyal 2001). Die ersten berichteten IAPs (*Cydia pomonella* (Cp-IAP) Crook et al. 1993, *Orgyia pseudotsugata* (Op-IAP) (Birnbaum et al. 1994) waren Proteine von, Insekten-befallenden, Baculoviren. Sie können die Apoptose in einer durch diese Viren befallene Zelle unterbinden und die virale Replikation ermöglichen.

IAPs gehören zu einer heterogenen, hochkonservierten Proteinfamilie, deren Hauptmerkmal 1-3 sog. BIR-Domänen (Baculovirus IAP Repeat) darstellen. Aus diesem Grunde werden sie seit kurzem auch BIRC (Baculoviral IAP-repeat-containing) Proteinen genannt (s. Tab 1.1). Dies sind Zystein- und Histidinreiche, ca 65 Aminosäure-lange Regionen, die direkt mit Caspasen wechselwirken können. Eine im C-Terminus lokalisierte RING-Domäne vermittelt den proteolytischen Abbau an Proteosomen über E3-Ubiquitin-Ligase und verstärkt somit den antiapoptotischen Effekt (Yang et al 2000, Review in Vaux et.al. 2005). Gleichzeitig sind IAPs im Stande, durch die RING Domäne, Homodimere und Heterodimere zu bilden, so dass unter Umständen eine Auto-Ubiquitination stattfinden kann. (Silke et al 2002). Während also die IAPs als eine Art Sicherung vor Zelltod wie z.B. bei niedriger Caspasenaktivierung der Adventitia während der normalen Funktion der Zelle (Roy et al. EMBO J. 1997) fungieren, muss gleichzeitig auch ihre Menge kontrolliert werden. Das geschieht zum Ersten über Auto-Ubiquitination mit Hilfe der RING Domäne und über IAP Antagonisten (s. Kap. 1.4).

Seit der Erstbeschreibung sind viele homologe Proteine der IAPs auch in Säugetieren identifiziert worden (XIAP, hIAP-1, h-IAP2, NAIP, survivin, Livin, Appolo, BRUCE). In Abb. 1.8 findet sich eine Übersicht der IAP in verschiedenen Organismen. In dieser Arbeit ist speziell die myokardiale Expression von XIAP und hIAP-1 im Menschen untersucht worden.

BIRC Nummer	alternative Namen	Chromosomenlokalisierung
BIRC1	NAIP	5q13.1
BIRC2	hIAP2, cIAP1, MIHB	11q22-q23
BIRC3	hIAP1, cIAP2, MIHC	11q22-q23
BIRC4	XIAP, ILP1, MIHA	Xq25
BIRC5	Survivin	17q25
BIRC6	BRUCE, Apollon	2p21-p22
BIRC7	ML-IAP, KIAP, Livin	20q13.1
BIRC8	ILP2	19q13.3

Tab 1.1. Übersicht der humanen Inhibitor of apoptosis Proteinfamilie (BIRC = Baculovirus IAP repeat containing Protein), mit den Synonymen und der jeweiligen Chromosomenlokalisierung.

1.3.1. XIAP

XIAP (X- chromosomal linked inhibitor of apoptosis protein) war einer der ersten im Menschen beschriebenen IAP (Liston et al. Nature 1996). Im gleichen Jahr wurde dieses Protein auch von weiteren 2 Arbeitsgruppen beschrieben **hILP** (Duckett et al. EMBO J. 1996), **MIHA** (Uren et al. PNAS 1996). In der späteren Literatur hat sich aber der Name XIAP durchgesetzt.

Das Gen ist in Xq25 lokalisiert (Rajcanseparovic et al 1996) und das Protein besteht aus 3 BIR Domänen im N-Terminus und eine RING Finger Domäne im C-Terminus (s. Abb. 1.8). Obwohl XIAP durch Caspasen gespalten werden kann, können die gespaltenen Fragmente die Caspase-Aktivität trotzdem inhibieren (Deveraux et al. 1999). Die Spaltung erfolgt in der Region zwischen BIR 2 und BIR 3. Diese Tatsache korreliert mit der Caspasen-Bindungsspezifität von XIAP. BIR 2 bindet die Caspasen 3 und 7 (Sun et. al. 1999; Takahashi et al. 1998) und BIR 3 bindet auf der Caspase 9 (Sun et al. 2000). Während aber die BIR 2 Domäne (und die Linker Region zu BIR 1) mit dem jeweiligen aktiven Zentrum von Caspase 3 und 7 direkt bindet (Chai et al., 2001; Huang et al., 2001; Riedl et al., 2001; Suzuki et al., 2001), bindet die BIR 3 Domäne an einer kleinen Untereinheit der aktivierten Caspase 9 und blockiert den Eintritt von Substraten im aktiven Zentrum der Caspase 9 (Srinivasula et al., 2001) und hemmt somit auf reversible Weise diese Caspase .

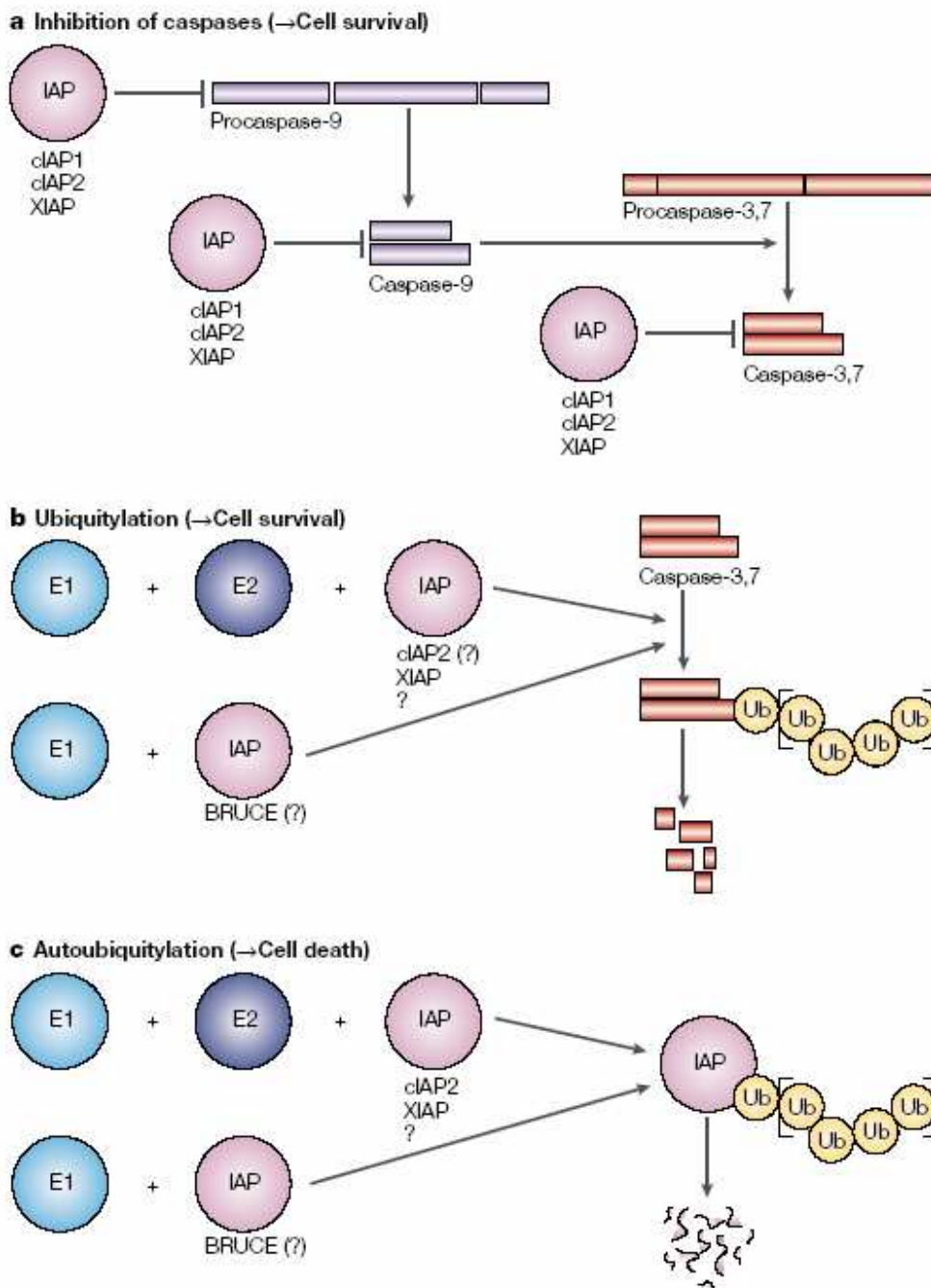


Abb 1.7 **Die unterschiedlichen Funktionen der IAPs.** A) XIAP, hIAP-1 (cIAP2) und hIAP-2 (cIAP1) binden direct mit aktivierten Caspasen und inhibieren sie. Zusätzlich interagieren sie mit der Procaspase-9 and verhindern ihre Aktivierung durch apoptotische Stimuli.

B) Der RING-Zink Finger von XIAP und hIAP-1 (cIAP2) fördert die Ubiquitylation der aktivierten Effektor-Caspasen. Die E3 Ligase Aktivität von XIAP führt zum Abbau der Caspase-3 und verstärkt somit die Apoptoseinhibition.

C) Die E3 ubiquitin Ligasen XIAP and hIAP-1 werden durch andere IAP ubiquityliert und durch Proteasomen abgebaut. (Aus Jesenberger et al 2002)

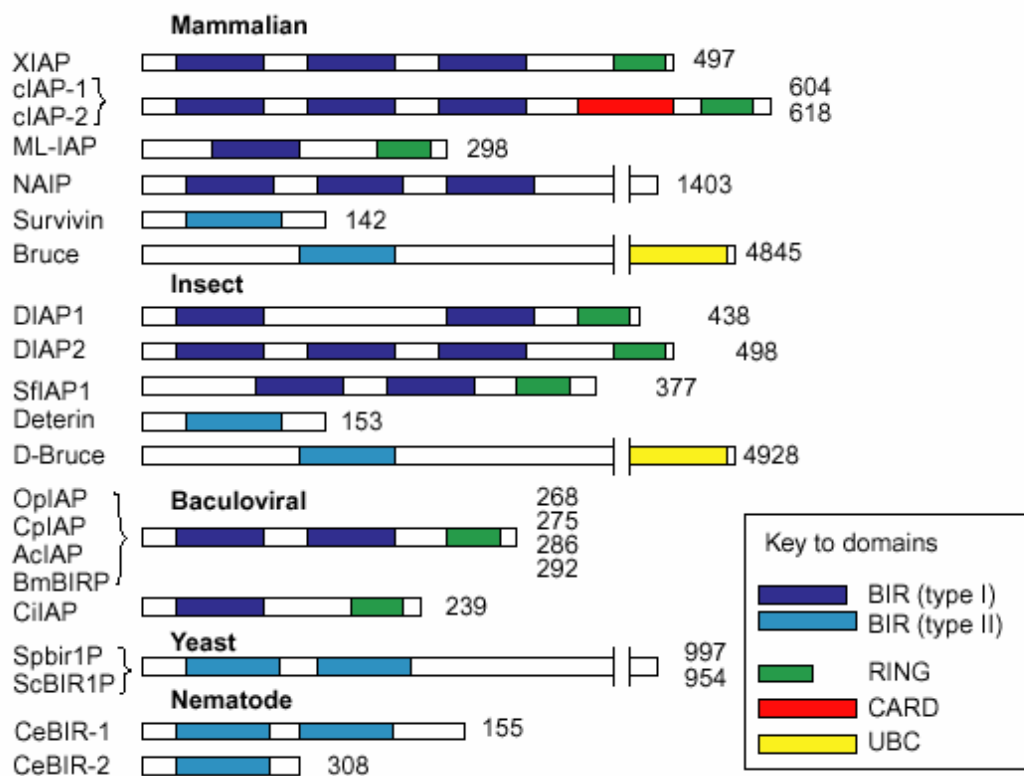


Abb 1.8 Ein Überblick über die IAP-Familie in verschiedenen Organismen und mit den unterschiedlichen Domänen. BIR Domänen Typ I sind ca 70 Aminosäure lang, BIR Typ II (Survivin Typ) sind länger (aus Verhagen et al 2001)

Von allen IAP weist XIAP die potentesten antiapoptotischen Eigenschaften auf. So konnte, bei Zellen die verschiedenen extrazellulären Reizen exponiert wurden, (UV-Licht, Chemotoxische Substanzen, Aktivierung des TNFR2 und Fas- Rezeptoren) die Apoptose durch XIAP-Gabe inhibiert werden. (Duckett et al. Mol. Cell. Biol. 1998). Diese starke antiapoptotische Eigenschaft verdankt XIAP der Möglichkeit die Aktivität sowohl der Effektor Caspasen -3 und -7 (Deveraux et al. Nature 1997) als auch der Initiator Caspase 9 (Deveraux et al. EMBO J. 1998) hemmen zu können. Die Caspasen -1, -6 und -8 dagegen werden von XIAP nicht beeinflusst (Deveraux et al. Nature 1997).

Darüber hinaus wirkt XIAP antiapoptotisch mit Hilfe der selektiven Aktivierung der JNK1 (c-Jun N-terminal Kinase 1, p38) (Sanna et al. PNAS 1998), ein Mitglied der MAP Kinasen Familie (mitogen-activating protein kinase) (Xia et al. Science 1995, Sugden, Clerk 1998) (s. Kap. 1.2.3) via Bindung mit TAK1 (Sanna et al 2002).

Ferner ist XIAP in der Lage über die BIR1 Domäne und mit Interaktion mit TAB1 (Lu M et al 2007) den zentralen Transkriptionsfaktor NF- κ B zu aktivieren (Lewis et al 2004), erhöht die Antioxidantienmenge und senkt somit die Produktion von freien Radikalen (ROS), vor allem über der Superoxiddismutase-2 (Karisalo et al 2007).

Interessanterweise sind XIAP defiziente Mäuse überlebensfähig und zeigen weder histopathologische Merkmale noch Defekte in der Induktion von Apoptose (Harlin et.al. 2001). Allerdings zeigte sich gleichzeitig eine erhöhte Expression von c-IAP1 und c-IAP2 (die Maus-Homologen von hIAP2 und hIAP1), als Hinweis für die Existenz eines Kompensationsmechanismus. Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, ist eine strenge Kontrolle der Apoptose in postmitotischen Zellen besonders wichtig. Somit erscheint, dass XIAP auch in gesunden Zellen ständig aktiviert ist um eine akzidentelle Apoptoseinduktion zu verhindern.

Seit kurzem sind Inhibitoren für XIAP bekannt, Smac, HtrA2/Omi und XAF-1. Das stöchiometrische Verhältnis zwischen XIAP und sein Inhibitoren scheint ausschlaggebend für die Apoptoseinduktion oder -inhibition zu sein. (s. Kap. 1.4)

1.3.2 hIAP-1 und hIAP-2

In der gleichen Zeit mit der Beschreibung von XIAP wurde auch **hIAP-1** (Liston et al. Nature 1996) (Synonyme: **cIAP-2**(Duckett et al. EMBO J. 1996) und **MIHC** (Uren et al. PNAS 1996) bekannt), sowie **hIAP-2** (Liston et al. Nature 1996), (Synonyme: **cIAP-1**(Duckett et al. EMBO J. 1996), **MIHB** (Uren et al. PNAS 1996) , beschrieben.

Beide Gene sind in 11q22-q23 (Rajcanseparovic et al 1996) lokalisiert. Die Nähe der genetischen Lokalisation (ca. 12 kbp) lässt eine erst seit kurzem bestehende Duplikation vermuten.

hIAP-1 und hIAP-2 wurden anfangs in einem TNF Rezeptor 2 Komplex entdeckt. Dabei gingen diese Proteine nur eine indirekte Bindung mit dem TNF-2 Rezeptor ein, denn sie hafteten an den TNF-Rezeptor –assoziierten Faktoren an (TRAF1 und 2 s. Kap. 1.2.3.) (Rothe et al 1995, Wang CY et al 1998). Somit können sie, unter der Voraussetzung einer Assoziation mit dem TNFR1, den Faktor NF- κ B aktivieren. Dieser blockiert die Aktivierung der Caspase-8 (Wang CY et al. 1998) und somit schon bei der Ebene der Initiator-Caspasen.

Kurze Zeit später konnte gezeigt werden, dass beide Proteine in der Lage sind die Caspasen -3, -6, -7 (Roy et al. EMBO J. 1997) und -9 (Deveraux et al. EMBO J. 1998) direkt zu inhibieren.

hIAP-1 und hIAP-2 enthalten wie XIAP und NAIP drei BIR-Domäne und interessanterweise, als einzige Mitglieder der IAP-Proteinfamilie, eine CARD Domäne (s. Kap 1.2.1), die aber nicht mit den Caspasen interagiert und deren Funktion noch nicht bekannt ist.

1.3.3 Andere Mitglieder der IAP Proteinfamilie

NAIP (Neuronal apoptosis inhibitor Protein)

NAIP ist das erste beschriebene Mitglied der IAP, wird genetisch am Chromosom 5q13.1 lokalisiert (Roy et al. Cell 1995, Liston et al 1996) und besitzt im Gegensatz zu den anderen IAP keinen RING-Finger. NAIP wird exprimiert vor allem in neuronalem Gewebe und zwar in Motoneuronen und nicht in den sensorischen Neuronen (Liston et al. 1996). Eine Expression des NAIP im Herzen konnte bis jetzt nicht beobachtet werden. Außerdem weist dieser Faktor auch andere strukturelle Unterschiede zu den anderen IAP auf, die Bindung an Caspase-9 ist ATP abhängig und es wird von IAP Antagonisten nicht beeinflusst, was einen gesonderten Inhibitionsmechanismus impliziert. (Davoodi et. al. 2004)

Survivin

Survivin (Ambrosini et al. 1997) ist das kleinste Protein der IAP und wird im Chromosom 17q25 kodiert. Zusätzlich zeigt das Survivin Gen Eigenschaften G₂/M regulierter Gene mit zwei Zellzyklus-abhängigen Elemente (CDE), einer Zellzyklus Genhomologie Region (CHR) sowie Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Sp1). (Li, F et al. 1999)

Das Protein weist nur eine BIR Domäne auf und enthält statt einen RING Finger eine „α helical coiled“ Domäne.

Survivin wird exprimiert in allen Geweben im embryonalen und fetalen Stadium inklusiv dem Herzen. Danach wird es im normalen Gewebe herabreguliert und außer dem Thymus nur bei Tumoren wieder hoch exprimiert z.B. Magen-ca (Lu CD et al. 1998) aber auch Lungen-, Kolon-, Pankreas-, Mamma-ca (Ambrosini et al. 1997) und zwar vor allem in der G₂/M Phase.

Survivin unterscheidet sich von anderen IAP in einer Reihe von Punkten. Erstens unterliegt Survivin einer ausgeprägten transkriptionellen Regulation mit verstärkter Expression während der G2/M-Phase des Zellzyklus (Li F et al 1998). Zweitens ist es in hohem Maße in proliferierenden Geweben nachweisbar, jedoch abwesend in terminal differenzierten Geweben wie im adulten Herzen (Ambrosini et al. 1997). Darüber hinaus ist eine Hochregulation von Survivin in einer Reihe von Tumoren und transformierten Zelllinien nachgewiesen (Ambrosini et al. 1997/ Tamm et al. 1998).

Ein Hinweis auf eine antiapoptotische Rolle von Survivin während der Proliferation von Zellen erwächst aus der Beobachtung, dass Survivin mit dem Spindelapparat assoziiert und diese Assoziation für die antiapoptotische Aktivität entscheidend ist (Li F et al 1998). Ein Eingreifen in die normale Funktion von Survivin durch Expression von antisense cDNA oder dominant negativen Mutanten führte ebenfalls zum verstärkten Auftreten von Apoptose und vielfältigen Zellteilungsdefekten wie z. B. Polyploidie oder Bildung von multipolaren Spindelapparaten. Ursächlich hierfür ist eine Zerstörung des Gleichgewichtes zwischen Survivin, Caspase 3 und p21 innerhalb der Zentrosome (Li F et al. 1999).

Die Expression von Survivin korreliert in den meisten Tumoren oft mit einer schlechteren Prognose, so dass es als Biomarker zur Diagnose, Progression und Therapieerfolg in verschiedenen Tumorarten benutzt werden kann. (Ai et al. 2007, Byunn et al. 2007, Linguang et 2007, Lu B Gonzales et al. 2004, Marioni G et al 2006, Shariat et al 2007, Vegran et al. 2005)

BRUCE/Apollon (Hauser et al 1998/ Chen et al. 1999)

BRUCE in Unterschied zu den anderen IAP ist ein riesiges (530 kDa) mit einem ORF von 14490bp Größe, welches als membranständiges Protein im Golgi Apparat und Vesikeln lokalisiert. (Hauser et al. 1998). Es enthält eine BIR Domäne in der Nähe des N-Terminus und besitzt als Einziges unter den IAP eine UBC-Domäne, ein Merkmal typisch für Ubiquitin konjugierende Enzyme.

BRUCE wirkt antiapoptotisch zum Einen mit Hilfe der BIR Domäne (Bartke et al. 2004) und zum Zweiten über seine E2/E3 Ubiquitin Ligase Eigenschaft, wobei der IAP-Antagonist Smac (s. Kap 1.4) als Substrat dient (Bartke et al. 2004, Hao et al. 2004, Qiu und Goldberg 2005). Im Falle einer Apoptoseinduktion wird es über drei Mechanismen antagonisiert. Erstens durch

Bindung von Smac, zweitens durch die Protease HtrA2 und drittens über Caspase vermittelter Spaltung (Bartke et al. 2004).

ML-IAP/Livin/ KIAP

ML-IAP ist vor allem in verschiedenen Carcinoma Zell-Linien exprimiert sowie Tumoren wie, Melanom, Dickdarm, im kolorektalen Karzinom oder Nierenzellkarzinom (Vucic et al. 2000/ Kasof et al 2001/ Lin et al 2000)

1.4 IAP-Antagonisten

IAP dienen der strengen Regulation akzidenteller Caspase-Aktivierung unter normalen Bedingungen. Damit die Apoptose tatsächlich stattfinden kann muss der inhibitorische Effekt der IAP überwunden werden. Im Falle von XIAP kann diese Inaktivierung über Caspase-abhängiger Spaltung erfolgen (Deveraux et al. 1999). Je höher die Caspase-Aktivierung, desto mehr IAP werden gespaltet. Dadurch werden wiederum mehr Caspasen aktiviert und dieser Prozess verstärkt. Die IAP werden zusätzlich über einen spezifischen Inhibitor, Smac (second mitochondria-derived activator of caspases, Du et al. 2000) auch als DIABLO bekannt (Direct IAP-binding protein with low pI, Verhagen et al. 2000)

Smac/DIABLO wird während der Apoptose von der mitochondrialen Außenmembran freigesetzt und interagiert mit den BIR2 und BIR3 Domäne von XIAP (Wu et al 2000) via ein IAP Binding Motif (IBM) (s. Abb. 1.9). Diese Sequenz ist homolog zur Caspase-9 Region, die mit XIAP bindet, so dass Caspase-9 und Smac/DIABLO sich kompetitiv verhalten (Srinivasula et al 2001). Somit kann ein neun Aminosäure langes Peptid des Smac/DIABLO N-Terminus die Interaktion von XIAP und Caspase-9 unterbinden. (Liu et al. 2000) und die Apoptoseauslösung über die Caspasen -3 und -9 hängt direkt vom stöchiometrischen Verhältnis zwischen XIAP und Smac/DIABLO ab.

Andere Proteine können sich auch an XIAP binden und seine Funktion inhibieren wie z.B. Omi/HtrA2 (Suzuki, Imai et al 2001, Hedge et al 2002, Martins et al 2002, Verhagen et al 2002, Yang QH et al. 2003). Durch Autoproteolyse von Omi/HtrA2 entsteht eine aktivierte Form, die im Zytosol freigesetzt wird. Bei der Proteolyse wird eine IBM ähnlich zu Smac/DIABLO

aktiviert, dass mit BIR2 und BIR3 interagiert. Dabei kann Omi/HtrA2 XIAP anhand seiner Serinprotease-Aktivität spalten und irreversibel inaktivieren (Yang QH et al. 2003). Die Rolle, die Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 bei der kardialen Apoptose spielen muss noch weiter untersucht werden. Es scheint, dass die Caspase-Aktivierung nicht nur die proteolytische Aktivierung der jeweiligen Enzymen voraussetzt, sondern auch die Elimination des inhibitorischen Einflusses der IAP.

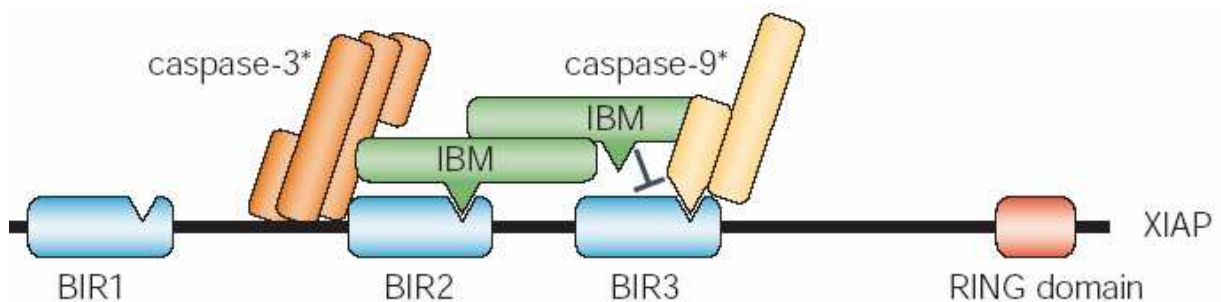


Abb 1.9 Ein Modell wie XIAP mit den aktivierten Caspasen -3 und -9 interagiert. Proteine mit einer IAP-bindende Sequenz „IAP-Binding Motif“ (IBM) können diese Interaktion unterbinden (aus Vaux DL, Silke J 2005)