

6. Diskussion

Herzinsuffizienz wird in den meisten Fällen durch Verlust an Kontraktilität und/oder kontraktile Masse verursacht. Für den Zelluntergang sind Nekrose, Apoptose (Crow et al. 2004) und Autophagie (Klionsky DJ, Emr SD 2000) in unterschiedlichem Maße verantwortlich. Es folgt eine Neustrukturierung des Myokards mit Abnahme der Wandstärken, ventrikulärer Dilatation, Aktivierung von Fibroblasten, Myokardvernarbung, Veränderungen des Zytoskeletts, Störung der Kalzium-Homöostase, Veränderung der Rezeptordichte und Einschränkung der Pumpfunktion. (Anversa 2000, Schaper et al. 1999).

Darüber hinaus führt die Aktivierung der apoptotischen Signalkaskade per se, ohne Zelluntergang, zu einer Reihe Maladaptationsmechanismen (von Harsdorf 2004). So führte Apoptoseinhibition in postinfarziellem Granulationsgewebe von Ratten zu deutlich verbessertem Remodelling gegenüber der Kontrollgruppe (Hayakawa K et al. 2003). Zusätzlich beeinflussen die Caspasen, die einen zentralen Bestandteil der Apoptosekaskade darstellen, kardiale Strukturen unabhängig von ihrer apoptotischen Funktion. (Communal et al. 2002). So konnte nachgewiesen werden, dass sie Myofilamente direkt angreifen können und somit zur kontraktile Dysfunktion beitragen können (Kostin et al. 2003, Moretti et al. 2002).

In dieser Arbeit wurde die Expression der Apoptoseinhibitoren hIAP-1 und XIAP bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz untersucht. Deren Existenz im neonatalen Myokard von Ratten war zuvor beschrieben (Bergmann et al. 2001). Zum ersten Mal konnten hier die Apoptoseinhibitoren im adulten humanen Myokard nachgewiesen werden (Scheubel et al. 2002). Diese Apoptoseinhibitoren stellen ein sehr attraktives Forschungsgebiet dar, denn sie sind in der Lage Caspasen direkt zu inhibieren und auch aktivierte Caspasen über ihre Ubiquitineigenschaften aus der Zelle zu eliminieren. Sie besitzen somit beide Eigenschaften mit denen die Caspaseaktivität reduziert werden kann.

XIAP kann darüber hinaus nach seiner Aktivierung durch NF- κ B Antioxidantien, insbesondere die Superoxiddismutase-2, erhöhen und somit den Anfall an freien Radikalen reduzieren (Kairisalo et al 2007). Eine Inhibition von NF- κ B wiederum führt zu einer Zunahme der Apoptose, erhöhtem Aufkommen an freien Radikalen und einer Herabregulation der Mn-Superoxiddismutase und XIAP (Dai et al. 2005).

In der Arbeit von Scheubel et al. konnte gezeigt werden, dass der Vorgang der Apoptose im linken Ventrikel von terminal herzinsuffizientem Myokard tatsächlich aktiviert ist. Die Initiator Caspasen -8 und -9 sind aktiviert, die extramitochondriale Cytochrom c Konzentration ist erhöht (wie auch Narula et. al. 1999 zeigte) und die anti-apoptotische Splice-Variante Caspase-9S war um 50% reduziert. Die verfügbaren Materialproben stammen aus gesamten linken Ventrikeln und beinhalten daher nicht nur Kardiomyozyten. Die Kardiomyozyten aber machen 90% des linken Ventrikelvolumens aus, somit muss davon ausgegangen werden, dass der größte Anteil der gemessenen Veränderung von Kardiomyozyten stammt. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Effektorcaspase-3 nicht aktiviert war. Somit ist bei den Kardiomyozyten die Apoptose zwar aktiviert, wird aber selten zu Ende ausgeführt. Dafür kommen drei Möglichkeiten in Betracht.

Erstens die unter diesen apoptotischen Vorgang anfallenden aktivierten Formen der Caspase-3 werden effektiv eliminiert z.B. über die E3 Ubiquitin Ligase-Eigenschaften der Apoptoseinhibitoren oder über uns noch unbekanntes Mechanismen. Somit wird der endgültige apoptotische Untergang der Kardiomyozyten verhindert.

Zweitens ist der Apoptosevorgang nach Aktivierung der Caspase 3 sehr schnell, so dass zu einem bestimmten Zeitpunkt nur sehr wenige Zellen (ca 0,05%) (Scheubel et al. 2002) im gesamten Myokard im Endstadium der Apoptose detektierbar sind.

Drittens Apoptose kann auf Caspase-unabhängigen Weg stattfinden wie durch Apoptosis inducing factor AIF (Susin et al 1999, Review in Crow et al. 2004), Endonuclease G (EndoG) (Li LY et al. 2001, Review in Wang X 2001), Omi/HtrA2 (Kroemer, Martin 2005), erhöhtes Aufkommen freier Radikale (reactive oxygen species, ROS) (Chipuk, Green 2005), p38 MAPK (Ohta et al. 2007). Das Schlüsselereignis dafür ist die Permeabilisation der mitochondrialen Außenmembran (MOMP, mitochondrion outer membrane permeabilization).

Entgegen unserer initialen Hypothese waren die Apoptoseinhibitoren nicht hoch- sondern herabreguliert. Beide Gene zeigten einen großen interindividuellen Unterschied sowohl bei Patienten als auch bei Spendern, waren aber dabei immer auf ähnlicher Weise beeinflusst und deren Expression im jeweiligen Patient bzw. Spender korrelierten direkt miteinander.

Diese Herabregulation von hIAP-1 und XIAP konnte auch auf Proteinebene gezeigt werden (Abb. 6.1). Auf Proteinebene war die, auf mRNA Ebene grenzwertig signifikante, XIAP Herabregulation signifikant.

Somit ist die Verzögerung zwischen zytosolischer Apoptoseaktivierung und nukleärer DNA-Spaltung nicht einer erhöhten hIAP-1 und XIAP Aktivität zuzuschreiben.

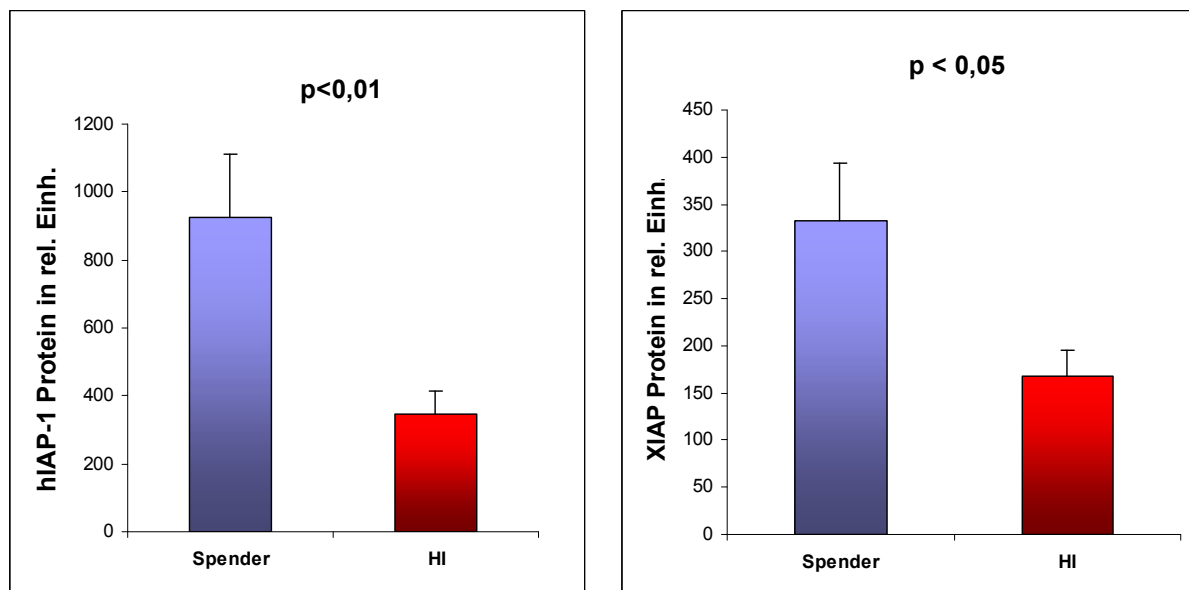


Abb. 6.1 Western Blot Analyse der Expression von hIAP-1 und XIAP bei Spendern und Patienten mit Herzinsuffizienz (HI).

Es gibt mehrere denkbare Gründe für dieses Ergebnis. Eine Möglichkeit ist, dass die IAPs keine Rolle bei der kardialen Apoptose spielen. Das ist aber eher unwahrscheinlich, denn dann dürfte überhaupt kein Unterschied der Expression in Vergleich zu Spendermyokard geben. Vielmehr werden die Apoptoseinhibitoren auf mehreren Ebenen angegriffen und deren Herabregulation scheint wichtig für den Progress der Apoptose zu sein auch ohne die Caspaseaktivierung.

Bei der Herabregulation der IAPs könnten die IAP-Antagonisten (smac/DIABLO, HtrA2/Omi) eine große Rolle spielen (s. Kap. 1.4). So können die IAPs über die IAP-bindende Motiven (IBM) sich an Smac/DIABLO binden und diese über ihre Ubiquitineigenschaften versuchen zu eliminieren (Vaux et al 2005).

Andererseits kann HtrA2/Omi anhand seiner Serinprotease-Aktivität XIAP spalten und somit inaktivieren. (Yang QH et al 2003). Tatsächlich zeigten transgene Mäuse mit kardial-

spezifischen Überexpression von TNF, typische Zeichen einer dilatativen Kardiomyopathie begleitet mit erhöhter Apoptose. Dabei waren die zytosolischen Konzentrationen für HtrA2/Omi und smac/DIABLO deutlich erhöht und hIAP-1 und hIAP-2 Konzentrationen reduziert (Haudek et al 2007). Zur Zeit sind aber keine Untersuchungen dieser Substanzklasse im humanen myokardialen Gewebe publiziert worden.

Darüber hinaus können IAPs sich selbst durch Ubiquitylierung eliminieren. (Jesensberger, Jentsch 2002) und vor kurzem wurde gezeigt, dass IAP Antagonisten in der Lage sind diese Autoubiquitylierung an hIAP-1 zu induzieren (Varfolemeev et al 2007).

Somit ist diese Herabregulation ein Zeichen eines erhöhten Verbrauchs der IAPs im Rahmen der Einhaltung einer fragilen Balance zwischen Apoptose und Überleben und gleichzeitig als Marker einer fortschreitenden Herzinsuffizienz zu deuten. Mitunter scheint die Elimination von IAPs auch wichtig für die Apoptose zu sein

Diese Erkenntnis wird durch die Ergebnisse von transgenen Mäusen mit einer Überexpression von hIAP-1 (cIAP2) unterstützt. Wenn diese Mäuse einem Infarkt, durch Ligation des Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie, ausgesetzt werden sind die verursachten Infarktareale signifikant kleiner als bei Wildtyp und weisen deutlich weniger histologische Apoptosemerkmale auf. Somit führt eine Überexpression von hIAP-1 zu einer größeren Resistenz gegenüber Apoptose und Ischämie/Reperfusion Trauma (Chua et al. 2007).

Nächster Angriffspunkt gegen die IAPs ist ihre genetische Regulation über Transkriptionsfaktoren, die immer noch nicht gänzlich bekannt ist. Erst in letzter Zeit wurde berichtet, dass TNF α in Endothelzellen hIAP-1 und hIAP-2, aber keine XIAP, Transkription über p38 MAP Kinase induzieren kann (Furusu et al. 2007). In Fibroblasten kann es aber auch XIAP Produktion induzieren (Sethi et al. 2007). TNF α ist erhöht exprimiert in Kardiomyozyten (Giroir et al 1992, Yokoyama et al. 1997), aber es führt zur Aktivierung sowohl pro- als auch antiapoptotischer Signalwege. (Kubota et al 2001)

Noch interessanter ist die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B von dem es bekannt ist, dass XIAP, hIAP-1 und hIAP-2 Expression hochregulieren kann (Bubici et al 2004, Kaur et al 2005, Tang et al 2001). Schon 1998 konnte bei Patienten mit Herzinsuffizienz gezeigt werden, dass NF- κ B im postischämischen Narbenbereich und im Bereich von Inflammation

besonders hoch- und dagegen in Bereichen mit normaler Morphologie kaum exprimiert war (Wong et al 1998). NF- κ B knockout Mäuse zeigten nach Infarkt eine deutlich bessere kardiale Funktion und höheres Überleben als Wildtyp (Kawano et al 2006). NF- κ B silencing mittels RNA interference in Myo-Tg transgene Mäuse, die normalerweise durch Myotrophin Überexpression eine Hypertrophie entwickeln, führte zu einer deutlichen Reduktion dieser Hypertrophie und Expression des Überlastindikators Atrio-Natriouretisches Peptid (ANP) (Gupta et al. 2008).

Die gleiche Gruppe untersuchte 2005 mittels eines Gene-array die NF- κ B Zielgene bei Patienten mit Herzinsuffizienz mit als einzigen IAP Vertreter das Gen hIAP-1. In Einklang mit unseren Ergebnissen konnte keine erhöhte Expression von hIAP-1 beobachtet werden (Gupta S, Sen S 2005). Interessanterweise ist NF- κ B in Monozyten bei Patienten mit kardialer Kachexie wiederum im Vergleich zu nichtkachektischen Herzinsuffizienzpatienten und zu Gesunden reduziert. (Siednienko et al 2007).

Wie diese Ergebnisse zu erklären sind und welche Faktoren eine Rolle bei der Entscheidung welche der NF- κ B Zielgenen tatsächlich exprimiert werden spielen, ist sicherlich ein spannendes Forschungsfeld auch im Hinblick von NF- κ B und NF- κ B-Signalwege als pharmakologisches Ziel.

Auswirkung der Pharmakotherapie auf die Expression von XIAP und hIAP-1

Herzinsuffizienz ist ein komplexes Krankheitsbild mit einer Kombination an mechanischen und biologischen Ursachen. Nicht alle Patienten mit einer reduzierten linksventrikulären Funktion weisen die Symptome einer Herzinsuffizienz auf. Außer der mechanischen Überlastung spielen auch neuroendokrine und immunologische Faktoren eine Rolle. Zwei dieser Faktoren sind das adrenerge und das Renin-Angiotensin-Aldosteron System. Nach initialen erfolgreichen Studien Ende der 70er Anfang der 80er Jahren (Swedberg et al 1979) wurde in zahlreichen Studien (Pfeffer et al CHARMS-Overall 2003, CIBIS 1999, CONSENSUS 1991, MERIT-HF 1999, SOLVD-T 1991 u.a.) eine deutliche klinische Verbesserung der Patienten unter Betablocker und ACE-Hemmer Therapie festgestellt (Review in Mann, Bristow 2005).

In der Fragestellung ob eine unterschiedliche Pharmakotherapie eine Veränderung der Apoptoseinhibitoren bewirkt wurden sehr unterschiedliche Muster beobachtet.

Das hIAP-1 Gen war unter fast allen Therapieregimes niedriger exprimiert als in der Kontrollgruppe.

Insgesamt zeigte eine ACE-Hemmer Therapie keine besondere Wirkung auf der mRNA Expression der IAPs gegenüber die Patienten ohne ACE-Hemmer zu haben.

Eine Therapie mit Betablocker führt tendenziell zu einer stärkeren Herabregulation der Apoptoseinhibitoren bei ischämischer Kardiomyopathie und hat den gegenteiligen Effekt bei Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie. Hier ist allerdings die Patientenzahl der Patienten mit Betablocker in der Medikation zu gering. Insgesamt wurden nur 7 Patienten mit Betablocker behandelt. Das ist erklärbar dadurch, dass die Patienten Mitte bis Ende der 90er Jahre transplantiert wurden, wo die Betablockermedikation nicht weit verbreitet war und dass die Medikation aufgrund der verschlechterten hämodynamischen Situation pausiert werden musste. Bei einer semiquantitativen Messung der Apoptoseinhibitoren wo 18 Patienten Betablocker erhielten, wiesen Patienten ohne Betablocker tendenziell niedrigere Konzentrationen an hIAP-1 und XIAP als Patienten ohne Medikation auf (Scheubel et al. 2002). Eine Therapie mit Betablocker und ACE-Hemmer erhöht tendenziell die hIAP-1 Konzentration im Vergleich zu den Patienten ohne diese Medikamente.

Auffällig niedrigere Konzentrationen, und somit ein Zeichen höherer Apoptoseaktivität, an XIAP und hIAP-1 wiesen Patienten mit Nitrate und Kalziumantagonisten in der Medikation auf. Patienten mit Nitrateinnahme wiesen als einzige Patientengruppe, eine signifikant stärkere Reduktion der Apoptoseinhibitoren als Patienten ohne diese Substanzgruppe. Als Erklärung dafür kann entweder endotheliale Dysfunktion (Gori et al. 2001) unter Nitroglyzerinmedikation oder die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) (Münzel et al 2002). Möglicherweise führt Nitroglyzerin zu einer Entkopplung der Atmungskette im Mitochondrion, einer erhöhte Produktion an freien Radikalen und Öffnung der MPTP (mitochondrion permeability transition pore) mit anschließender Permeabilisation der mitochondrialen Außenmembran (Gori et al 2007) und Induktion der Apoptose.

IAPs und verschiedene Formen der Herzinsuffizienz

Eine weitere Beobachtung der Ergebnisse dieser Arbeit ist, dass die Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie tendenziell niedrigere Konzentrationen der Apoptoseinhibitoren aufwiesen als die Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie.

Die Unterschiede an hIAP-1 und XIAP Expression in Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie und ischämischer Kardiomyopathie ist ein Hinweis dafür, dass obwohl klinisch der Zustand einer terminalen Herzinsuffizienz bei beide Patientengruppen identisch ist, es andere Mechanismen, oder eine unterschiedliche Ausprägung einer Vielzahl von Mechanismen von Regulation und Gegenregulation, auf molekularer Ebene stattfinden. Diese Veränderungen zu analysieren wird unser Verständnis für das Symptomkomplex Herzinsuffizienz voranbringen und könnte zu neuen Wegen einer differenzierteren, der Pathophysiologie entsprechenden, Pharmakotherapie führen.