

Aus dem Institut für Pathophysiologie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Holtz)

**mRNA-Expression endogener Baculovirus homologer Inhibitoren der Apoptose (IAPs) im  
insuffizienten Myokard.**

**Dissertation**  
zur Erlangung des akademischen Grades  
**Doktor der Medizin (Dr. med.)**

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Konstantinos Drogaris  
geboren am 02.03.1976 in Palaio Faliro, Athen

Technischer Betreuer: Dr. rer. nat. D. Darmer  
Gutachter: Prof. Dr. med. J. Holtz  
Prof. Dr. rer. nat. H. Morawietz (Dresden)

Eröffnungsdatum des Promotionsverfahrens: 26.02.2008

Datum der Verteidigung: 17.06.2008

**urn:nbn:de:gbv:3-000014364**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014364>]

Ουδέν χρήμα μάτην γίγνεται,  
αλλά πάντα εκ λόγου τε και υπ' ανάγκης

Nichts entsteht planlos  
sondern aus Sinn und unter Notwendigkeit

(Leukipp von Milet 5 Jh. v. Chr.)

## Referat

In den letzten Jahren wurde aus einer Reihe von Arbeiten die herausragende Rolle der Apoptose nicht nur für immunologische Prozesse und in der Krebsforschung sondern auch bei den kardiovaskulären Erkrankungen deutlich. In dieser Arbeit wurde die Rolle der Apoptoseinhibitoren XIAP und hIAP-1 untersucht. Sie sind Teil einer hochkonservierten Proteinfamilie, der Inhibitor of Apoptosis proteins (IAP) und sind in der Lage anhand ihrer BIR Domäne an Caspasen, die zentralen Apoptoseexekutoren, zu binden und ihrer Aktivität zu inhibieren. Zudem können die IAP auch über einer RING Domäne und ihrer Ubiquitin E3 Ligase Eigenschaft die Caspasen eliminieren.

Im Rahmen einer Herztransplantation wurden transmurale, nichtvernarbte, linksventrikuläre Myokardproben von 27 explantierten, terminal insuffizienten Herzen genommen. Das Kontrollmaterial wurde von 20 aus klinischen Gründen nicht transplantierbaren Spenderherzen gewonnen. Alle Patienten hatten zuvor schriftlich über die wissenschaftliche Verwendung des Probematerials eingewilligt. Daraus wurde die Gesamt RNA gewonnen und anhand einer standard kalibrierten kompetitiven RT-PCR Reaktion die mRNA Konzentrationen von XIAP und hIAP-1 bestimmt.

In den Kardiomyozyten herzinsuffizienter Patienten ist Apoptose aktiviert, wird aber nur selten bis zum Auflösen der Zelle durchgeführt. Entgegen unserer initialen Vermutung sind die Apoptoseinhibitoren hIAP-1 und XIAP bei herzinsuffizienten Patienten nicht höher exprimiert sondern herabreguliert und zwar bei Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie stärker als bei Patienten mit einer ischämischer Kardiomyopathie, wobei es eine sehr große interindividuelle Variation gibt. Die mRNA Expression von XIAP und hIAP-1 bei individuellen Patienten korrelierten miteinander.

Die Therapieregimes beeinflussen die Genexpression von hIAP-1 und XIAP auf unterschiedlicher Weise. ACE-Hemmer tendieren zu einer Verminderung der IAP-Herabregulation bei Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie. Betablocker vermindern tendentiell die Herabregulation bei Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie, aber haben das gegenteilige Effekt bei Patienten mit einer ischämischen Kardiomyopathie. Kalziumantagonisten und Nitrate schließlich verstärken deutlich die Herabregulation der Apoptoseinhibitoren und scheinen somit die Apoptoseaktivität zu verstärken.

*Drogaris, Konstantinos: mRNA-Expression endogener Baculovirus homologer Inhibitoren der Apoptose (IAPs) im insuffizienten Myokard.  
Halle, Martin-Luther Universität, Med. Fak., Diss., 78 Seiten, 2008*

---

# I. Inhaltsverzeichnis

## Referat

<b>I. Inhaltsverzeichnis</b>	I
<b>II. Abkürzungsverzeichnis</b>	III

<b>1. Einleitung</b>	1
<b>1.1 Apoptose</b>	1
<b>1.2 Grundlagen der Apoptose</b>	3
1.2.1 Caspasen	3
1.2.2 Caspase Aktivierung	5
1.2.3 Der extrinsische Aktivierungsweg der Apoptose	5
1.2.4 Der intrinsische Aktivierungsweg der Apoptose	10
1.2.5 Die Bcl-2 Proteinfamilie: Regulatoren der mitochondrialen Aktivierung	10
1.2.6 Cytochrom c und Apoptoseaktivierung. Formierung des Apoptosomes	13
<b>1.3 Kardiale Apoptose und die Rolle der IAPs</b>	13
1.3.1 XIAP	15
1.3.2 hIAP-1/hIAP-2	18
1.3.3 Andere Mitglieder der IAP Proteinfamilie	19
<b>1.4 IAP-Antagonisten</b>	21
<b>2. Zielstellung</b>	23
<b>3. Materialien</b>	24
3.1 Chemikalien	24
3.2 Enzyme	25
3.3 Lösungen	25
3.4 Kits	26
3.5 Grossgeräte	27
<b>4. Methoden</b>	28
4.1 Probenmaterial	28
4.2 RNA-Präparation	28
4.3 Reverse Transkription	30
4.4 Aufbau der kompetitiven standard kalibrierten RT-PCR für XIAP und hIAP-1	31
4.4.1 Prinzip der Polymerasenkettenreaktion	32
4.4.2 Auswahl der Primer	34
4.4.3 PCR Ansatz	35
4.4.4 Kompetitive RT-PCR	35
4.4.5 Synthese der Standard DNA-Fragmente für die kompetitive RT-PCR	36
4.4.6 Bestimmung der Molekülzahl der Standard-DNA Fragmente	38

---

4.4.7	Auswertung der kompetitiven RT-PCR	38
4.5	<b>DNA Gelelektrophorese</b>	39
4.6	<b>Elution von cDNA Fragmenten aus Agarosegelen</b>	40
4.6.1	Elution über semipermeable Membran	41
4.6.2	DNA-Fällung	41
4.7	<b>Klonierung der PCR Fragmenten</b>	41
4.8	<b>Bakterienkulturen und Isolierung der Plasmid DNA</b>	43
4.9	<b>DNA Restriktion</b>	43
4.10	<b>DNA Sequenzierung</b>	44
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	46
5.1	hIAP-1 und XIAP mRNA Konzentrationen bei Herzinsuffizienz	46
5.2	Auswirkung der Pharmakotherapie auf hIAP-1 und XIAP mRNA-Konzentrationen.	50
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	54
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	61
<b>8.</b>	<b>Bibliographie</b>	62
<b>Thesen</b>		76
<b>A</b>	<b>Selbständigkeitserklärung</b>	
<b>B</b>	<b>Erklärung über frühere Promotionsversuche</b>	
<b>C</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	
<b>D</b>	<b>Tabellarischer Lebenslauf</b>	
<b>E</b>	<b>Danksagung</b>	

## II. Abkürzungsverzeichnis

Ax	Absorption (Absorption bei einer Wellenlänge von x nm)
Abb.	Abbildung
AIF	Apoptosis-inducing factor
ANP	Atrio Natriuretisches Peptid
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
ARC	Apoptosis Repressor with Caspase recruitment domain
AS Primer	Antisense Primer
ASK	Apoptosis Signaling Cascade
Bcl-Proteinfamilie	B-cell lymphoma- Proteinfamilie
Bid	
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
BH 1-4	Bcl-2 Homology domain 1-4
BIR	Baculovirus inhibitory Repeat
BIRC	Baculoviral IAP-repeat-containing
bp	Basenpaar(e)
BRUCE	BIR repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme
CARD	Caspase Recruiting Domain
Caspases	Cysteine-dependent aspartate-directed proteases
CDE	Cell Cycle Dependent Elements
cDNA	complementary DNA
cFLIP	cellular Fas-associated Protein with DD-like interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme or caspase-8 inhibitory proteins
CHARMS	Candesartan in Heart Failure: Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity Program
CHR	Cell cycle gene Homology Region
cIAP1	cellular IAP 1
cIAP2	cellular IAP 2
CIBIS II	Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II
CONSENSUS	Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study
Cp-IAP	Cydia pomonella-IAP
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
DdNTP	2',3'-Dideoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DCM	Dilatative Cardiomyopathie
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DIABLO/Smac	Direct IAP-binding protein with low pI/ Second mitochondria-derived activator of caspases
DISC	Death inducing signalling complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DR 1-6	Death Receptor 1-6
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

---

entf.	entfällt
et al.	und andere (lat.)
FADD	Fas associated Death Domain
FLIP	s. cFLIP
HI	Herzinsuffizienz
hIAP-1	Human Inhibitor of Apoptosis Protein-1
hIAP-2	Humaner Inhibitor of Apoptosis Protein-2
hILP	human Inhibitor of apoptosis like protein
HtrA2	High temperature requirement protease A2
GTC	Guanidinthiocyanat
IAPs	Inhibitor of Apoptosis Proteins
IBM	IAP-binding motif
ICM	Ischämische Cardiomyopathie
IL	Interleukin
ILP 2	Inhibitor of apoptosis like protein 2
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactoside
JNK	Jun amino kinase
Kap.	Kapitel
Kb	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
KIAP	Kindney Inhibitor of Apoptosis Protein
MAPK	Mitogen activated Protein Kinases
ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
MERIT-HF	Metoprolol Randomized Intervention Trial in Congestive Heart Failure
MIHA	Mammalian IAP Homologue A
MIHB	Mammalian IAP Homologue B
MIHC	Mammalian IAP Homologue C
ML-IAP	Melanoma Inhibitor of Apoptosis Protein
MOMP	Mitochondrion Outer Membrane Permeabilization
MPTP	Mitochondrion Permeabilitä Transitino Pore
mRNA	messenger RNA
NF $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B
NGFR	Nerve Growth Factor Receptor
NIK	Nuclear factor $\kappa$ B-inducing Kinase
Op-IAP	Orgyia Pseudotsugata-IAP
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
Puma	p53 up-regulated modulator of apoptosis
RING	really interesting new gene
RIP 1	Rezeptor-interacting-Protein 1
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reactive Oxygen Species
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
S Primer	Sense Primer
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
SOLVD-T	Studies of left ventricular dysfunction-Therapy
TAB1	TAK1-binding protein 1
TAK1	TGF $\beta$ -activated protein kinase 1
Tan	Annealing Temperature

---

TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TGF $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TNF-R1	Tumor Necrosis Factor Receptor 1
TRADD	TNF-R1-associated-Death Domain
TRAF 2	TNF-R-associated-Factor 2
TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand
TRAIL Rezeptor 1	TNF related apoptosis inducing ligand Rezeptor 1
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSPE-Puffer	Tris-Sarcosyl-Phenol-Na-EDTA Puffer
U	Enzymeinheiten
UBC	Ubiquitin conjugating enzyme
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactoside
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

## 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 $\beta$  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.

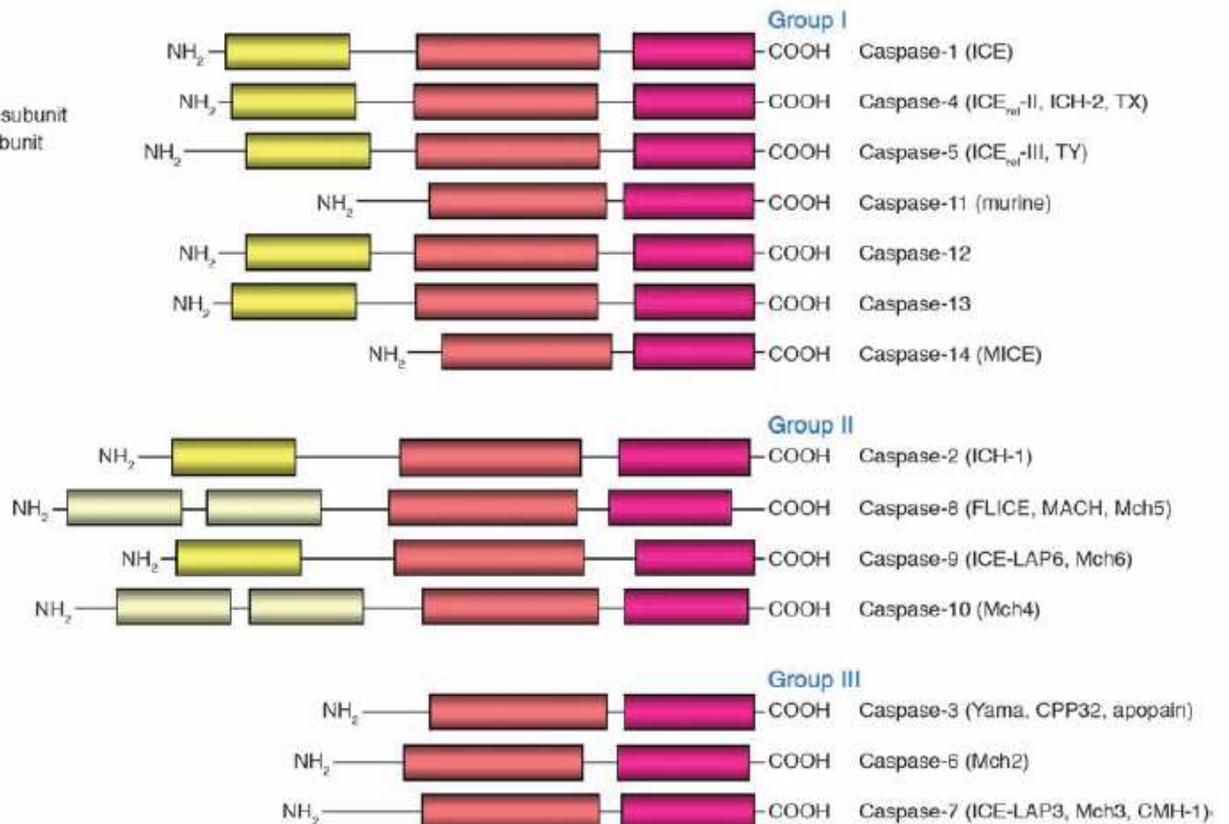


Abb. 1.1 Überblick der Caspasenfamilie. Gruppe I: Inflammatorische Caspasen, Gruppe II: Initiator Caspasen, Gruppe III: Effektor Caspasen (Aus Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005; 115(10): 2665-2672)

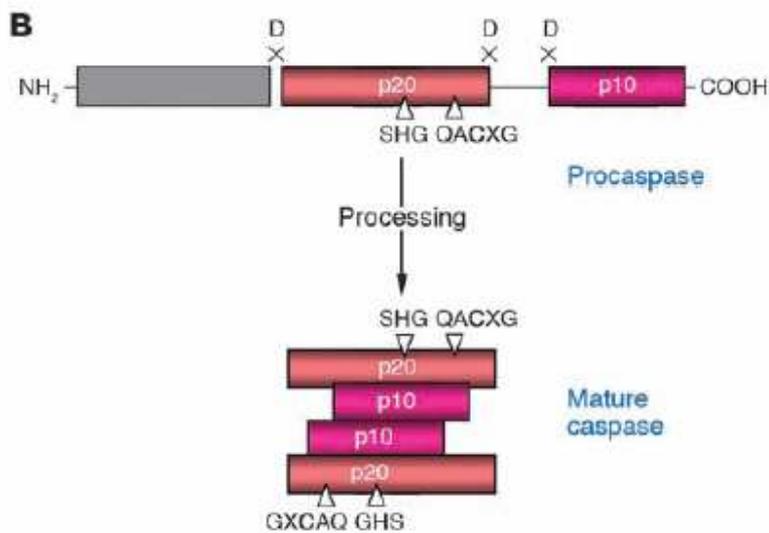


Abb 1.2. Konformationsänderung einer Caspase auf dem Weg von Procaspase zur aktivierten Caspase (Aus Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005; 115(10): 2665-2672)

## 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- $\alpha$ -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- $\alpha$  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 $\beta$ -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- $\alpha$  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  $\kappa$ B-inducing kinase), was schließlich zu einer erhöhten Aktivität des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ 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.

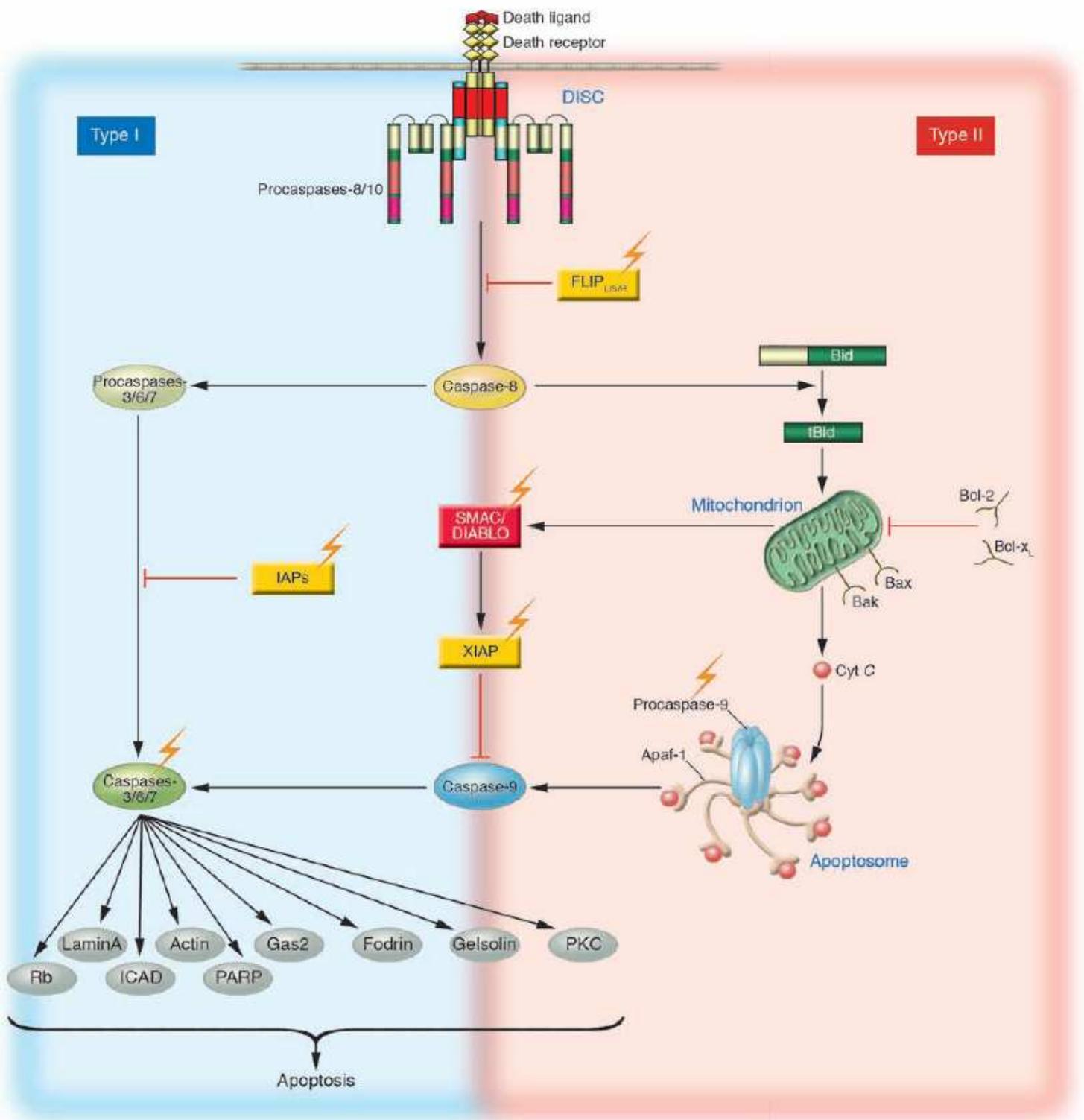


Abb 1.3. Schematische Darstellung des intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweges. (Aus Lavrik IN, Golks A, Kramer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005; 115(10): 2665-2672)

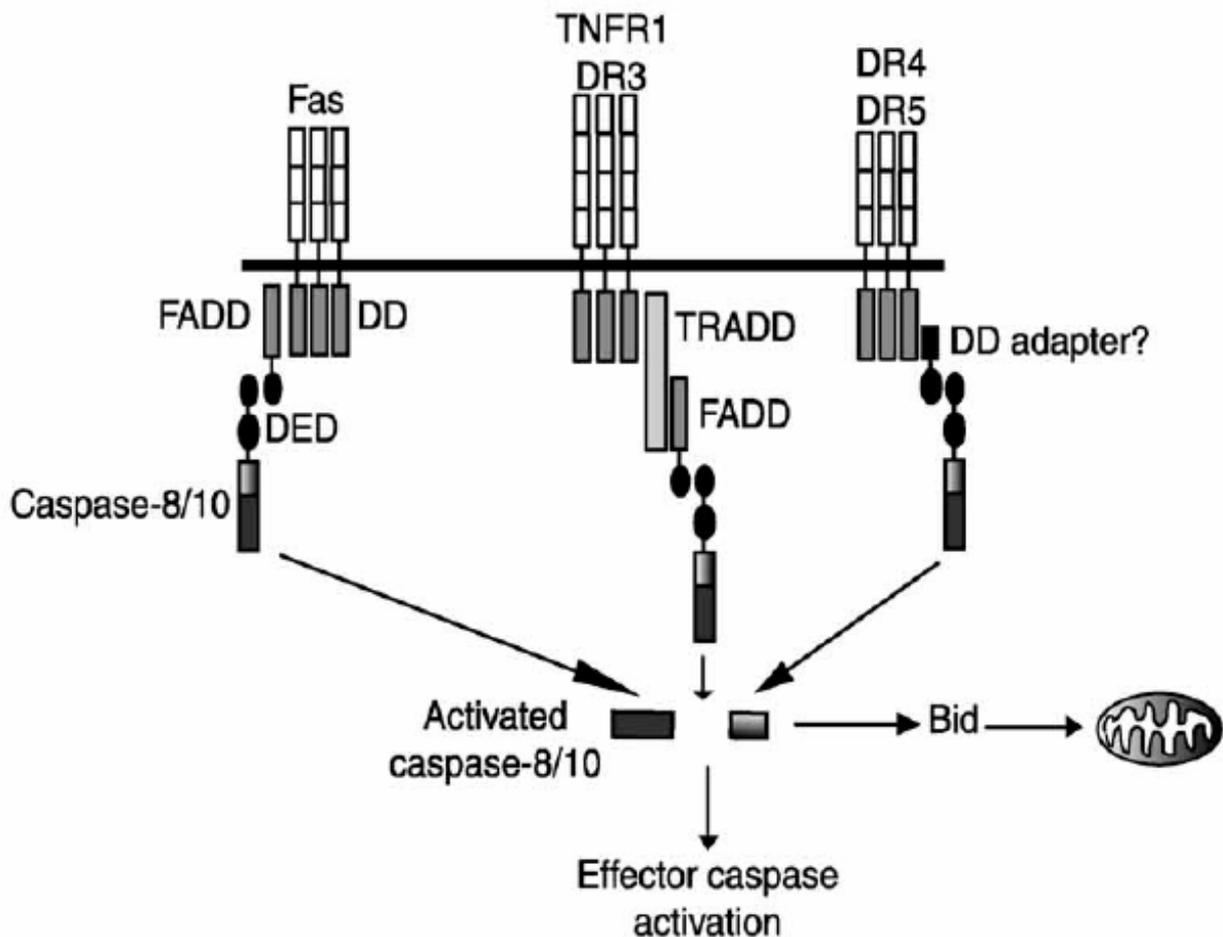


Abb 1.4 Aktivierung der Initiator Caspasen über den extrinsischen Apoptoseweg. An den Todesdomänen (DD) von einem Komplex aus jeweils drei Rezeptoren haften Adaptermoleküle, die eine Todeseffektordomäne (DED) besitzen und bilden ein DISC. Diese wiederum interagieren mit den DED der Initiatorcaspasen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

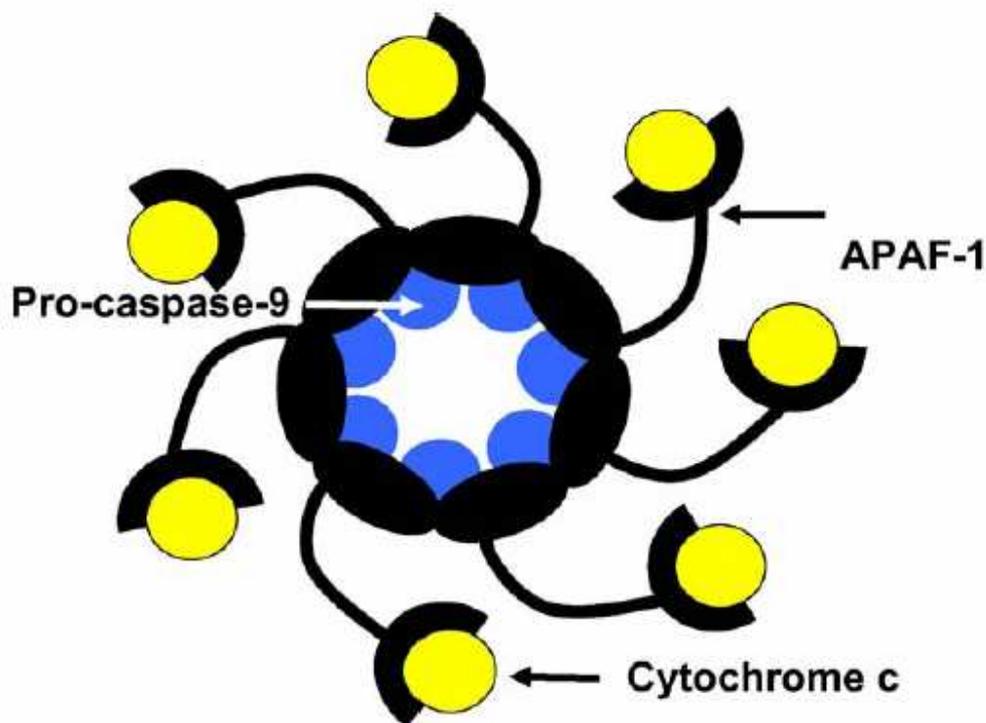


Abb 1.5 Das Apoptosom (aus Regula und Kirshenbaum 2005)

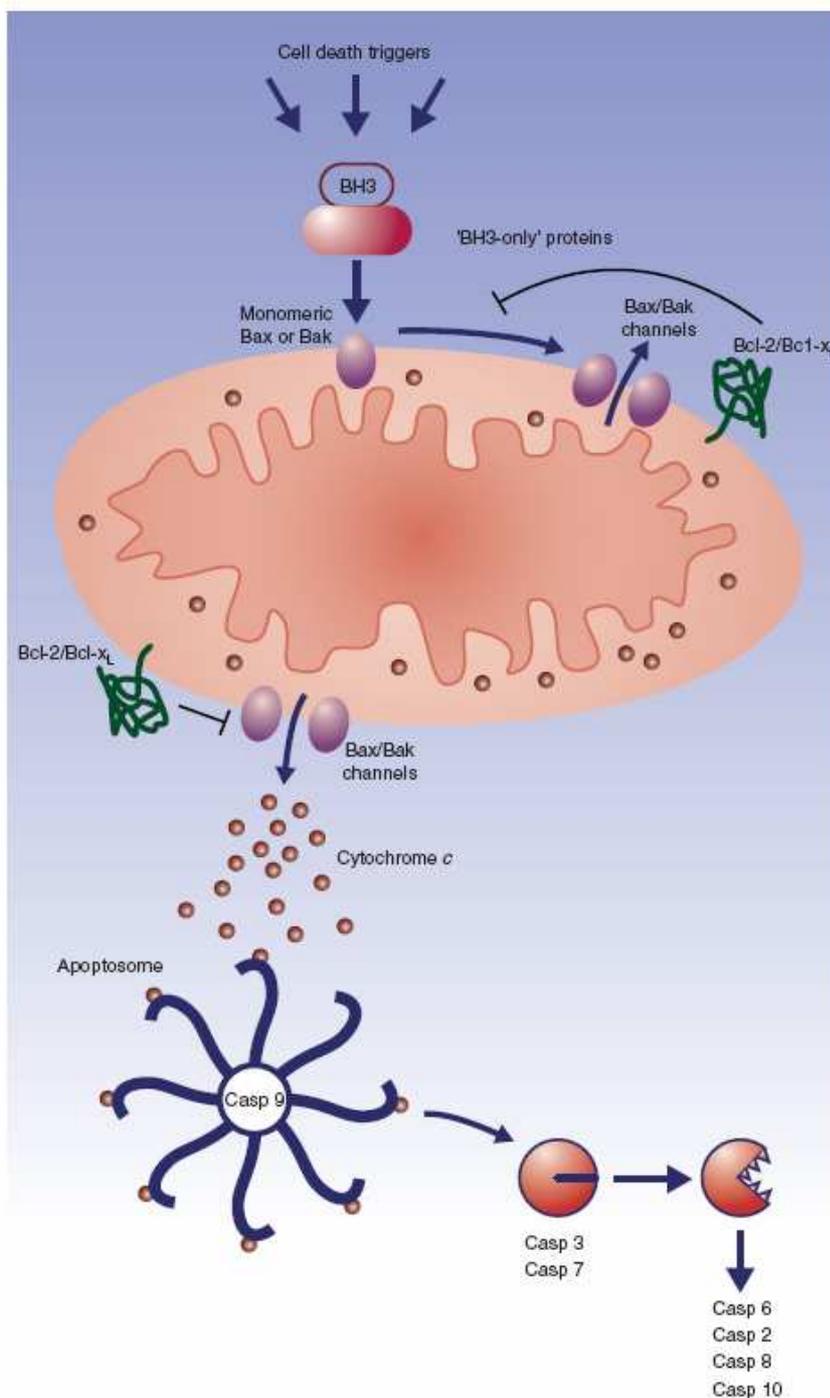


Abb. 1.6 Unterschiedliche Stressfaktoren wie DNA-Brüche, ionisierende Strahlung, Chemotherapeutika etc., führen zu Aktivierung von Bcl-2 Proteine die nur eine BH3 Domäne besitzen. (BH3-only Proteins) Die aktivierte Proteine translokieren vom Zytosol an der mitochondriale Aussenmembran und bewirken, dass 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 .

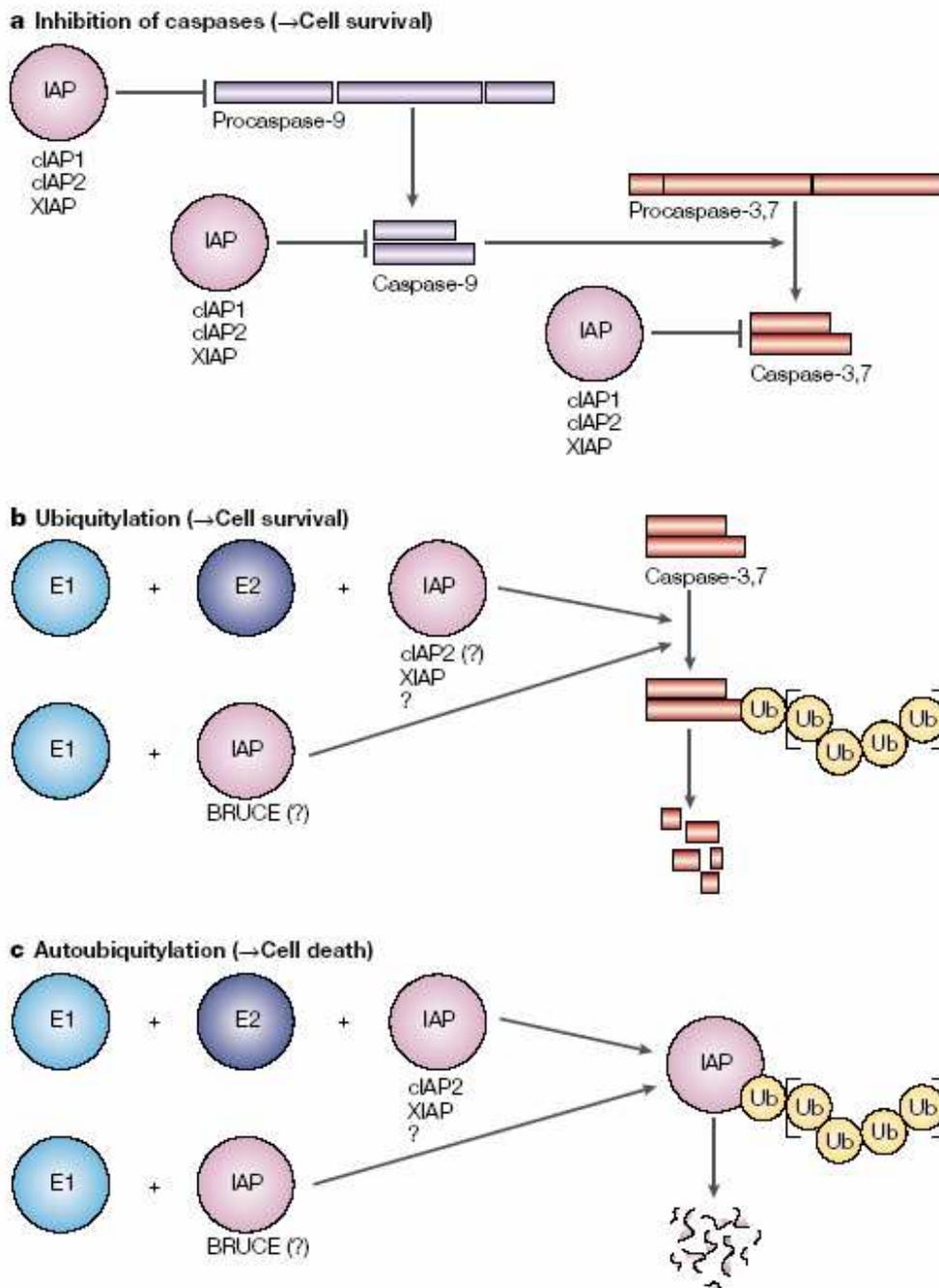


Abb 1.7 **Die unterschiedlichen Funktionen der IAPs.** A) XIAP, hIAP-1 (cIAP2) und hIAP-2 (cIAP1) binden direct mit aktivierten Caspasen und inhibieren sie. Zusätzlich interagieren sie mit der Procaspase-9 and verhindern ihre Aktivierung durch apoptotische Stimuli.

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)

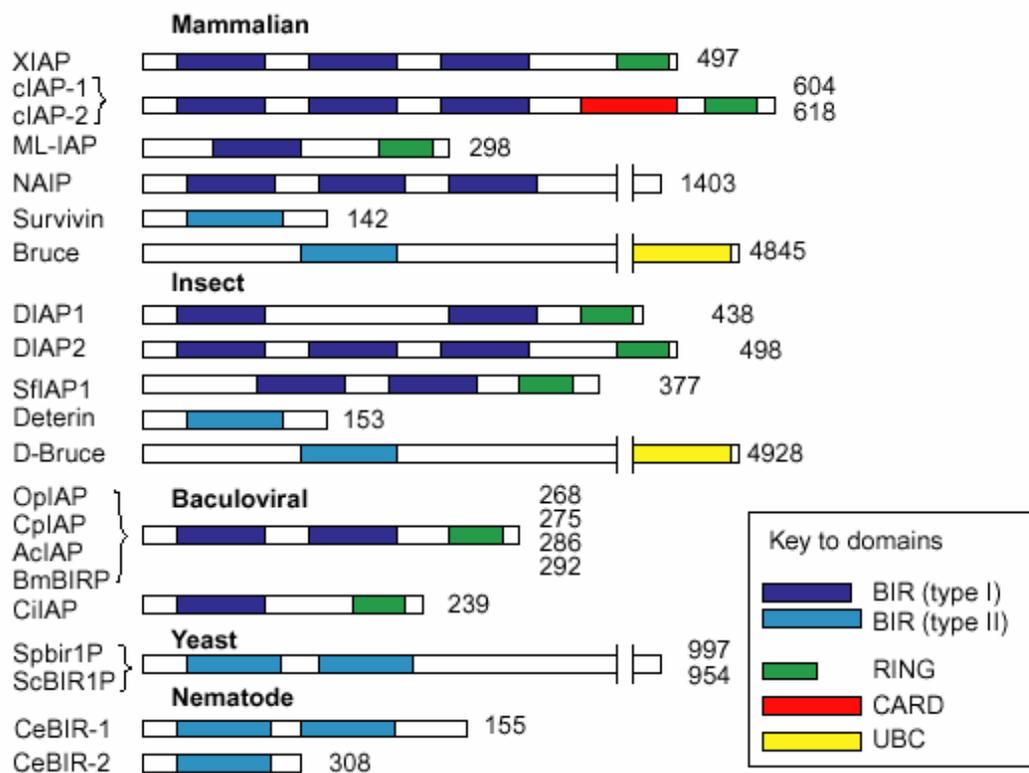


Abb 1.8 Ein Überblick über die IAP-Familie in verschiedenen Organismen und mit den unterschiedlichen Domänen. BIR Domänen Typ I sind ca 70 Aminosäure lang, BIR Typ II (Survivin Typ) sind länger (aus Verhagen et al 2001)

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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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 G<sub>2</sub>/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 G<sub>2</sub>/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.

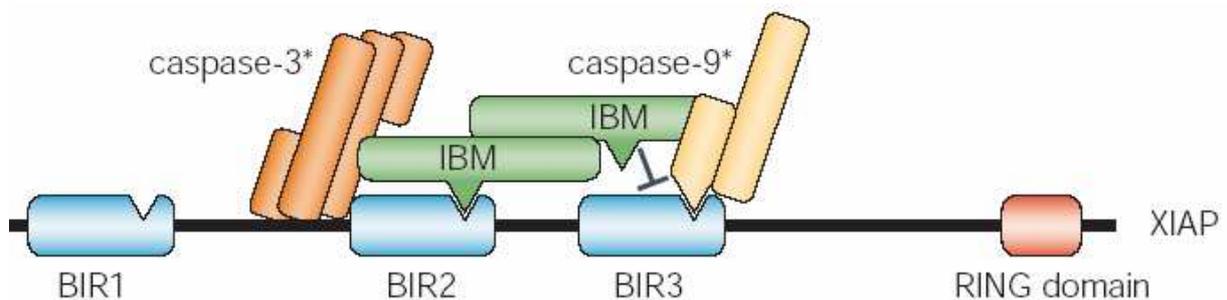


Abb 1.9 Ein Modell wie XIAP mit den aktivierten Caspasen -3 und -9 interagiert. Proteine mit einer IAP-bindende Sequenz „IAP-Binding Motif“ (IBM) können diese Interaktion unterbinden (aus Vaux DL, Silke J 2005)

## 2 Zielstellung

Bei terminaler Herzinsuffizienz (HI) ist Apoptose in Kardiomyozyten aktiviert, zeigt aber Besonderheiten, die in anderen Zelltypen nicht beobachtet werden: Während mitochondriales Cytochrom c in vielen Myozyten freigesetzt ist und nachfolgend zytosolische Caspasen und zytosolische Substrate aktiviert bzw. gespalten sind, findet man nur selten apoptotische DNA-Spaltung im Kern.

Vermutlich beeinträchtigt diese apoptotische Degradation zytosolischer Substrate schon die kontraktile Funktion, während noch unbekannte Mechanismen die Mehrheit der Kerne vor irreversibler DNA-Spaltung schützen. Endogene IAPs (inhibitor of apoptosis proteins), die Initiator- und Effektor- Caspasen hemmen, könnten zu diesem postmitochondrialen Schutz vor Kernapoptose beitragen. Die Apoptosewege über die Caspasen -3 und -9 werden durch IAPs reguliert (vgl. Abb.1.3). Wir untersuchten daher, ob die myokardialen IAPs hIAP-1 und XIAP (X-chromosome linked inhibitor of apoptosis) bei Herzinsuffizienz als Schutz vor dem Fortschreiten der zytosolischen Apoptose verstärkt exprimiert sind.

## 3 Materialien

### 3.1 Chemikalien

$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
Bromphenolblau	Merck
CsCl	Gibco-BRL (Invitrogen)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat(dNTP) 100mM	Gibco-BRL (Invitrogen)
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure	Merck
Glucose	Merck
Glycerin	Gibco-BRL (Invitrogen)
Guanidinthiocyanat (GTC)	Gibco-BRL (Invitrogen)
Isopropyl- $\beta$ -D-thio-Galctopyranosid 100 mM	Sigma
LB-Agar	Gibco-BRL (Invitrogen)
LB-Medium	Gibco-BRL (Invitrogen)
MgCl <sub>2</sub>	Merck
Natrium-Azetat	Sigma
Natrium-Dodecylsulfat	Serva
Natrium-EDTA	Merck
3-N-Morholino-propansulfonsäure (MOPS)	Roth
PCR-Primer	Gibco-BRL (Invitrogen)
Phenol	Amresco
Random Primer 3 $\mu$ g/ $\mu$ l	Gibco-BRL (Invitrogen)
Salzsäure	Merck
Sarcosyl (N-Laurylsarcosin)	Sigma
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth
Triton-X-100	Sigma
X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indol- $\beta$ -D-Galactopyranosid) 50 mg/ml	Promega

## 3.2 Enzyme

Taq-Polymerase (4 U/ $\mu$ l)	(AGS, Heidelberg)
Superscript <sup>TM</sup> II Reverse Transkriptase (200 U/ $\mu$ l)	(Invitrogen)
Eco R1 und Puffer	(Invitrogen)
RNase Inhibitor (40U/ $\mu$ l) RNaseOUT <sup>TM</sup>	(Invitrogen)

## 3.3 Lösungen

Agarosegel (DNA):	100 ml 1 x TBE 1,0 g Agarose erhitzen, bis Lösung klar ist abkühlen auf ca. 50° C, 1 % Ethidiumbromid zugeben
Bromphenolblau	5 ml Glycerol 4 ml EDTA pH 8,0 (250 mM) 1 ml Tris HCl pH 8,0 (1M) Orangephenolblau
CsCl-Kissen	5,7 M CsCl 100 mM Na-EDTA, pH 6,5 in DEPC-H <sub>2</sub> O ansetzen und steril filtrieren vor Gebrauch 6 mM $\beta$ -Mercaptoethanol hinzufügen
GTC-Lösung	4M Guanidinthiocyanat 1% Sarcosyl 25 mM Natrium Acetat, pH 6,0 1 mM Natrium EDTA, pH 6,5 1 M $\beta$ -Mercaptoethanol steril ansetzen Mercaptoethanol erst vor Gebrauch zusetzen

---

LB-Agar	37g/l autoklavieren
LB-Medium	25g/l autoklavieren
Loading Buffer für DNA-Gele	50% Glycerin 0,25% Bromphenolblau in 1x TBE-Puffer
SDS-Lösung	100g SDS in 900 ml H <sub>2</sub> O lösen (68°C) pH 7,2 mit HCl einstellen ad 1l H <sub>2</sub> O
SOC Medium	2% Tryptone 0,5% Hefe Extrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM Glukose
TBE-Puffer (10x):	0,89 M Tris-Base 0,025 M EDTA ad 1l H <sub>2</sub> O
TE-Puffer:	10 mM Tris pH 7,5 bzw. 8,0 1 mM EDTA
TSPE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,0 1% Sarcosyl 5% Phenol 1 mM Na-EDTA, pH 6,5 in DEPC behandeltem H <sub>2</sub> O lösen steril filtrieren

### 3.4 Kits

JETquick Plasmid Mini Prep	(Genomed, Bad Oyenhausen)
Midi Plasmid Kit	(Qiagen, Hilden)
pCR <sup>®</sup> II – Topo Cloning Kit	(Invitrogen, Groningen, NL)
Thermo Sequenase TM dye terminator cycle sequencing Kit	(Amersham LIFE SCIENCE)

---

### 3.5 Grossgeräte

Bakterienschüttler Certomat U/H	Braun, Melsungen
Brutschrank	Memmert GmbH&CoKG, Schwabach
Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Photometer Beckmann DU 600	Beckmann Coulter, Unterschleißheim
Refrigerated Superspeed Zentrifuge RC-5B	Sorvall, Newtown USA
Ultra-Turrax	IKA-Werke, Staufen
UV-Transilluminator	Schütt, Göttingen
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg

## 4 Methoden

### 4.1 Probenmaterial

Das in dieser Arbeit verwendete Probenmaterial wurde gewonnen, in Kooperation mit der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Universität Halle-Wittenberg, aus transmuralen, nicht vernarbten, linksventrikulären Myokardproben von 27 explantierten, terminal insuffizienten Herzen im Rahmen einer Herztransplantation. Das Kontrollmaterial wurde von 20 aus klinischen Gründen nicht transplantierbaren Spenderherzen gewonnen. Das Herzgewebe wurde kurz nach Entnahme (maximal fünf Minuten) in flüssigen Stickstoff eingelagert. Die Patienten und die Angehörige der Spender waren über die Verwendung des Gewebes für wissenschaftliche Zwecke aufgeklärt und hatten ihre Einwilligung gegeben. Erweiterte Information über die Charakterisierung der Patienten, z.B. anhand welcher Methodik die linksventrikuläre Ejektionsfraktionen bestimmt wurde, stand uns nicht zu Verfügung.

### 4.2 RNA-Präparation

Die Gesamt-RNA wurde aus dem Probenmaterial nach Chirgwin et.al. durch CsCl-Ultrazentrifugation präpariert. Zuerst wurden die zuvor in flüssigem Stickstoff gelagerten Proben gewogen, danach in Aluminiumfolie verpackt und sofort wieder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Gewicht der Probe sollte dabei 1/10 des Volumens an GTC-Lösung (8ml) nicht überschreiten. Anschließend wurden die Proben mit einem Hammer pulverisiert, wobei das Auftauen durch wiederholtes Eintauchen im flüssigen Stickstoff verhindert wurde. Das entstandene Pulver wurde mit einem Spatel in, 8 ml GTC-Lösung gefüllten, 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und dann sofort mit einem Ultraturax homogenisiert. Dieser wurde danach mit 0,1% SDS-Lösung und Aqua bidest gespült. 2,6 ml CsCl-Lösung wurden in einem Beckmann-Röhrchen (Ultrazentrifugen-Röhrchen für Sorval-SW 40-Rotor) pipettiert. Auf diese wurde vorsichtig das Homogenisat geschichtet. Die fertigen Probenröhrchen wurden bei 22°C und 150000 x g (ca 33 000 rpm) über 21 h zentrifugiert. Danach wurde der Überstand bis ca 1 cm vom Boden abgenommen und der Rest wurde so dekantiert, dass die Zwischenphase das entstandene RNA-Pellet nicht verunreinigen konnte. Den unteren Teil des Beckman-Röhrchens wurde mit einem Skalpell abgeschnitten und auf Eis gelegt.



### 4.3 Reverse Transkription

Die einsträngige mRNA wird durch reverse Transkription (RT) in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Eine doppelsträngige cDNA ist notwendig für die spätere Polymerasenkettenreaktion, da die Polymerase nicht Uracil wie in der mRNA sondern nur Thymin Basen verwenden kann. Zudem ist eine doppelsträngige cDNA viel stabiler und von ubiquitär vorkommenden RNAsen nicht degradierbar.

Für diese Reaktion wurde reverse Transkriptase aus Retroviren verwendet. Wie schon oben erwähnt ist die RNA unter normalen Umweltbedingungen aufgrund von ubiquitär vorhandenen, RNA denaturierenden Enzymen (RNasen) sehr labil. Deshalb muss mit grosser Sorgfalt sichergestellt werden, dass alle bei der reversen Transkription verwendeten Chemikalien und Geräte RNase-frei sind.

Die Reverse Transkriptase benutzt die mRNA als Template und baut dazu die entsprechende cDNA. Dazu sind Primer (Startermoleküle) benötigt, die komplementär an die mRNA binden können. Um die gesamte mRNA umzuschreiben verwendet man Hexanucleotid-Primer, die durch ihre Kürze an verschiedenen zufälligen Stellen der mRNA hybridisieren (daher auch random Primer benannt).

Der Ansatz für die reverse Transkription enthält pro Probe:

Random Primer (100 ng/μl)	4 μl
Gesamt-RNA x μl (250 ng)	2,5 μl

3 min 70o C; 5 min 1o C (während dieser Zeit Zugabe der folgenden Komponenten)

5x first strand-Puffer	5 μl
dNTP (je 12,5 mM)	1 μl
DTT (10 mM)	2,5 μl
RNase Inhibitor ( 40 U/μl)	0,5 μl
Super Script™ II RT (200 U/μl)	0,25 μl
DEPC-Wasser	ad 25 μl Gesamtansatzgröße

Der gesamte Ansatz wurde bei 42°C für eine Stunde inkubiert und die Reaktion durch dreiminütiges Erhitzen auf 95°C beendet. Die erhaltene cDNA wurde anschließend direkt in der PCR-Reaktion eingesetzt werden.

#### 4.4 Aufbau der kompetitiven Standard-kalibrierten RT-PCR für XIAP und hIAP-1

Viele Gene sind auf mRNA Ebene so niedrig exprimiert, dass sie direkt z.B. via Northern-Blot Hybridisierung kaum zu quantifizieren sind. Dieses Problem kann gelöst werden in dem eine reverse Transkription mit einer Polymerasenkettenreaktion verbindet. Dabei wird zunächst die einsträngige mRNA in einer doppelsträngigen cDNA umgeschrieben (Reverse Transkription.) Diese Doppelstrang DNA ist essentiell für die Polymerasenkettenreaktion, die die so gewonnene cDNA Sequenz vervielfältigen kann. Wenn man dazu zwei cDNA Sequenzen unterschiedlicher Länge nimmt und von einer davon die genaue Konzentration kennt, kann man die genaue Konzentration der zweiten DNA eruieren. Beide Templates werden miteinander um die Substrate der Reaktion kämpfen und es kommt zu unterschiedlichen Ergebnissen. Wenn man von der zu untersuchende cDNA verschiedene Konzentrationen nimmt und immer gegen die gleiche Konzentration an Standard cDNA hybridisieren lässt, kommen Banden unterschiedlicher Größe und Luminiszenz in der Gelelektrophorese zu Stande. (s. Abb. 4.1)

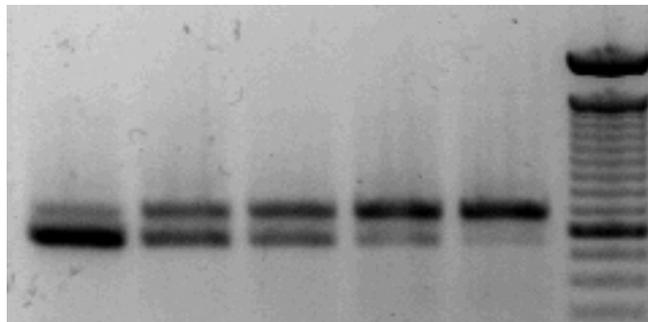


Abb 4.1 Beispiel einer kompetitiven RT-PCR. Die untere Bande entspricht den Standard in, von links nach rechts gesehen, abnehmender Konzentration. Die obere Bande entspricht das zu untersuchende Material. Rechts am Rand die molekulare Skala. Mit zunehmender Konzentration des Standards wird weniger Zielsequenz DNA amplifiziert

Die Gele wurden dann photographiert und densitometrisch analysiert und die Konzentration der zu untersuchende cDNA kalkuliert. (s. Kap 4.4.5)

#### 4.4.1 Prinzip der Polymerasenkettenreaktion

Die durch die reverse Transkription entstandene cDNA wurde mittels der Polymerasenkettenreaktion (PCR) in einem Thermocycler (TRIO Thermoblock Biometra, Göttingen) amplifiziert. Jede PCR besteht aus drei Schritten die mehrmals zyklisch wiederholt werden. (s. Abb. 4.2)

Im 1. Schritt werden die entstandenen Doppelstränge durch Erhitzen auf 95°C getrennt.

Im 2. Schritt werden die Proben auf der die Oligonukleotid-Primer an die DNA hybridisieren können (Annealing Temperatur)

Im 3. Schritt wird die Probe auf 72°C erwärmt, weil die Taq-DNA Polymerase bei dieser Temperatur ihr Synthesoptimum erreicht. An den Primern beginnend ergänzt sie dann den DNA Einzelstrang zu einem Doppelstrang. Anschließend werden die Proben wieder auf 95°C erhitzt und somit ein neuer Zyklus initiiert. Theoretisch verdoppelt sich so bei jedem Zyklus die DNA-Menge. Nach 30 Zyklen würde sich die Anzahl der Zielmoleküle auf  $2^{30}$  d.h. ca.  $1,07 \times 10^9$  erhöhen. In Praxis wird aber dieser Wert aufgrund von abnehmenden Konzentrationen an Substraten (dNTPs und Primern), wegen unvollständigem Annealing und unvollständiger Strangsynthese nicht erreicht. Abhängig der Expression des Zielmoleküls, wählt man die Anzahl der PCR Zyklen (zwischen 20 und 40). Für die kompetitive PCR ist der Ziel diese Zyklenanzahl so auszuwählen, dass die Reaktion nicht im Sättigungsbereich der Reaktionskurve liegt. Tabelle 4.1 zeigt eine Übersicht über die Primer und Bedingungen der verwendeten PCR.

Gen	Primer	Primersequenz (in -5' zu -3' Richtung)	Fragmentgröße (bp)	Tan (°C)	Zyklen
h-IAP-1	S	GTT CAT CCG TCA AGT TCA AG	680	52	33
	AS	GTT CTT TCT TCT GGT AGT CTC C			
XIAP	S	GAT GCT GTG AGT TCT GAT AGG	446	52	33
	AS	CTT AAT GTC CTT GAA ACT GAA C			

Tab. 4.1. Übersicht der Primer und der Reaktionsbedingungen für die PCR. Tan Annealing Temperatur

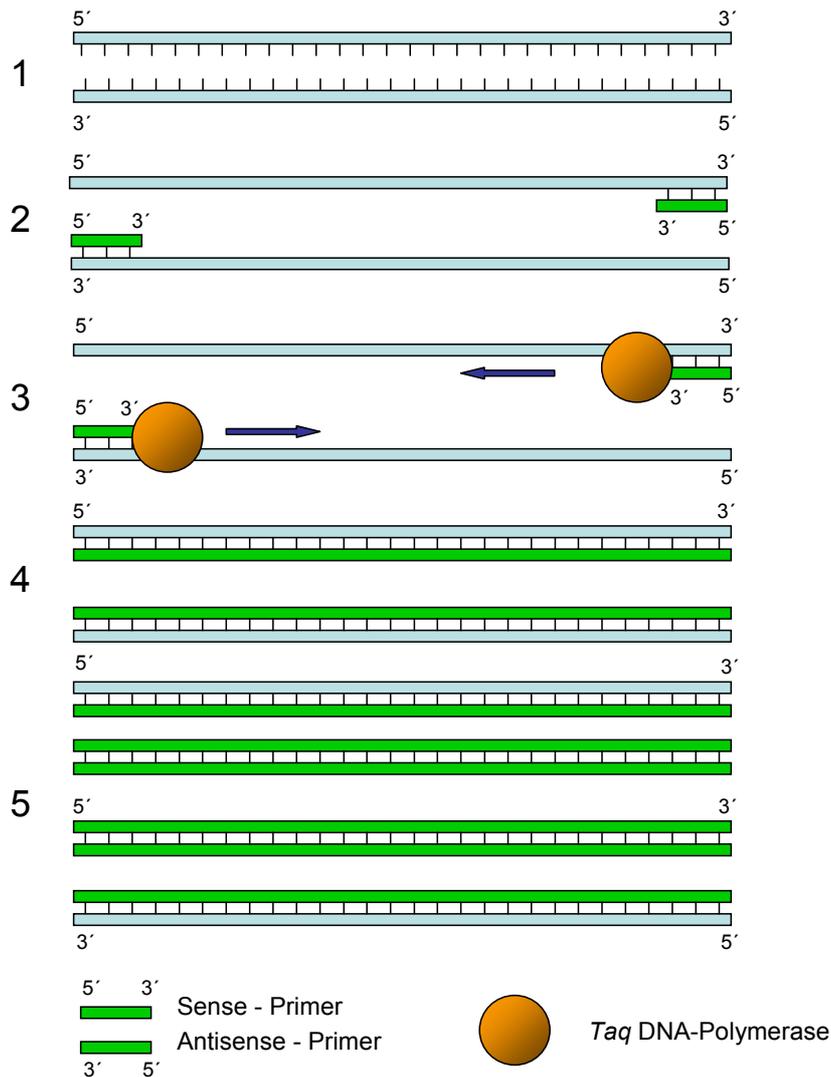


Abb 4.2. Ablauf einer Polymerasekettenreaktion. 1. DNA wird auf 95°C erhitzt und in zwei Strängen getrennt. 2. Kühlung des Reaktionsgemisches auf der Annealing Temperatur und anhaften der Primer. 3. DNA Polymerase bindet an Primer und DNA und beginnt mit DNA-Synthese. 4. Entstehung zwei kompletter DNA Produkte nach einem Zyklus 5. Nach 2 Zyklen Entstehung vier DNA Produkten.

Anschließend wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Gele wurden photographiert, die daraus entstandene Negative eingescannt und weiter ausgewertet (s. Kap 4.4.5).

### 4.4.2 Auswahl der Primer

Primer sind kleine Oligonukleotidsequenzen (zwischen 8 und 20 Basen Länge). Sobald die DNA durch Erhitzen in zwei Stränge geteilt ist haften diese Oligonukleotide an den Sense- bzw. Antisense DNA-Strang. Sie dienen als Startsequenz für die DNA Polymerase.

Die Primer wurden mittels DNA-Software (Generunner) nach folgenden Kriterien ausgewählt:

- i. Die Primer sollten ein 300 bis 600 bp langes PCR-Produkt liefern. Diese Länge erleichtert die Auftrennung im Agarosegel und verringert die Wahrscheinlichkeit, dass die DNA Polymerase den DNA-Strang nicht vollständig abliest. Bei der kompetitiven RT-PCR würde dies möglicherweise aufgrund der Längedifferenz auch die Amplifikation von Standard und Zielsequenz unterschiedlich beeinflussen. Zudem liegt die Fehlerquote der Taq DNA-Polymerase bei 1 pro 10000 bp. Je kürzer das zu amplifizierende Fragment, desto weniger die Wahrscheinlichkeit der Amplifizierung falscher Fragmenten.
- ii. Um die Verunreinigung der RNA mit genomischer DNA erkennen zu können, ist es günstig, Sense und Anti-sense-Primer in zwei unterschiedliche Exone zu legen. Ein PCR Produkt der DNA würde sich aufgrund der darin enthaltene Introns als deutlich größere Bande darstellen
- iii. Sense- und Antisense-Primer sollten eine gleiche, möglichst hohe Schmelztemperatur haben. Dadurch kann eine relativ hohe Annealing-Temperatur gewählt werden, wodurch Mispriming (Hybridisieren an falsche Matrize) unwahrscheinlicher wird.
- iv. Die Primersequenzen sollten mit einer Sequenz-Datenbank verglichen werden, um eine Erzeugung unerwünschter PCR-Produkte auszuschliessen.
- v. Die Primer sollten eine geringe Tendenz zur Ausbildung von Sekundärstrukturen (z.B. Haarnadelschleifen) zeigen und keine Dimere bilden
- vi. Die Sense- und Antisense-Primer sollten jeweils an nur eine Stelle im Zielfragment anhaften können.

### 4.4.3 PCR Ansatz

Für eine PCR wurde wie folgt ein 25µl Ansatz auf Eis pipettiert,

10x PCR Buffer	2,5µl
dNTP (200µM)	1,5µl
Sense Primer (10 pmol/µl)	0,5µl
Antisense Primer (10 pmol/µl)	0,5µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,2µl
RT Ansatz	1,0µl
Standard (unterschiedliche Verdünnungsreihen)	2,0µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 25µl

danach mit 2 Tropfen Mineralöl bedeckt, kurz geschüttelt und zentrifugiert. Die PCR fand in einem Thermoblock mit folgender Programmierung statt:

Schritt 1	Denaturieren	95°C	3 min
Schritt 2	Denaturieren	95°C	30 sec
Schritt 3	Primer Annealing	52°C	30 sec
Schritt 4	DNA Synthese	72°C	30 sec
Schritt 5	33 Zyklen der Schritte 2 bis 4		
Schritt 6	Abschluss DNA Synthese	72°C	5 min
Schritt 7	Kühlen	4°C	

### 4.4.4 Kompetitive RT-PCR

Eine genaue Quantifizierung von mRNA-Transkripten ermöglicht die kompetitive RT-PCR. Dabei wird mehreren RT-Reaktionen eine konstante Menge Gesamt-RNA sowie Standardmoleküle zugefügt. Weil die Standardmoleküle die gleichen Primer-Bindungsstellen wie die zu messende Zielsequenz haben, werden die Standards bei der nachfolgenden PCR-Reaktion in gleicher Weise amplifiziert. Durch die unterschiedliche Länge von Standard- und Zielsequenz, stellen sich in der Gelelektrophorese zwei unterschiedliche Banden dar. Sind die Banden gleich stark, waren auch in der RT-Reaktion ebenso viele Standard- wie Zielsequenzmoleküle vorhanden. Aus der bekannten Menge der Standards ergibt sich so die

---

Expressionshöhe der Ziel-mRNA. Durch mathematische Verfahren lassen sich sogar absolute mRNA- Molekülzahlen ermitteln (s. Kap. 4.4.5)

#### **4.4.5 Synthese des Standard DNA-Fragmente für die kompetitive RT-PCR**

Für die Durchführung einer kompetitiven RT-PCR wird die Konstruktion eines internen Standards vorausgesetzt. Dieser sollte folgende Eigenschaften in sich vereinen

- Damit der Standard genauso vervielfältigt wird wie die Zielsequenz, muss er die gleichen Primer-Bedingungen besitzen.
- Um den Standard bei der Elektrophorese gut von der Zielsequenz trennen zu können, soll er sich um 100-150 bp von dieser unterscheiden.

Die Konstruktion der Standards, dargestellt in Abb. 4.3, wurde mit Hilfe von einem sog. Linker-Primer nach Förster (Förster 1994) durchgeführt.

Als erstes wurde eine normale PCR mit den spezifischen Sense- und Antisense-Primer durchgeführt. Bei der ersten Reamplifikation wurde 1 µl einer 1:1000 Verdünnung der ersten Reaktion genommen und anstelle des Antisense Primers ein Linker-Primer benutzt. Dieser besteht aus einer Teilsequenz innerhalb des Zielprodukts (nested primer) und aus einem Teil (10 bp) des 3`-Ende des Antisense-Primers. Es entsteht eine verkürzte Sequenz, die am Ende ein Stück des Antisense-Primer-Bindungsstelle besitzt. Vom entstandenen Produkt wurde wiederum 1µl einer 1:1000 Verdünnung für eine erneute PCR eingesetzt. Beim nächsten Schritt wurden wieder die Sense- und Antisense-Primer benutzt. Die so entstandene Sequenz ist gegenüber der Zielsequenz um eine bestimmte Länge verkürzt und besitzt die gleiche Antisense-Primer-Bindungsstelle wie die Zielsequenz.

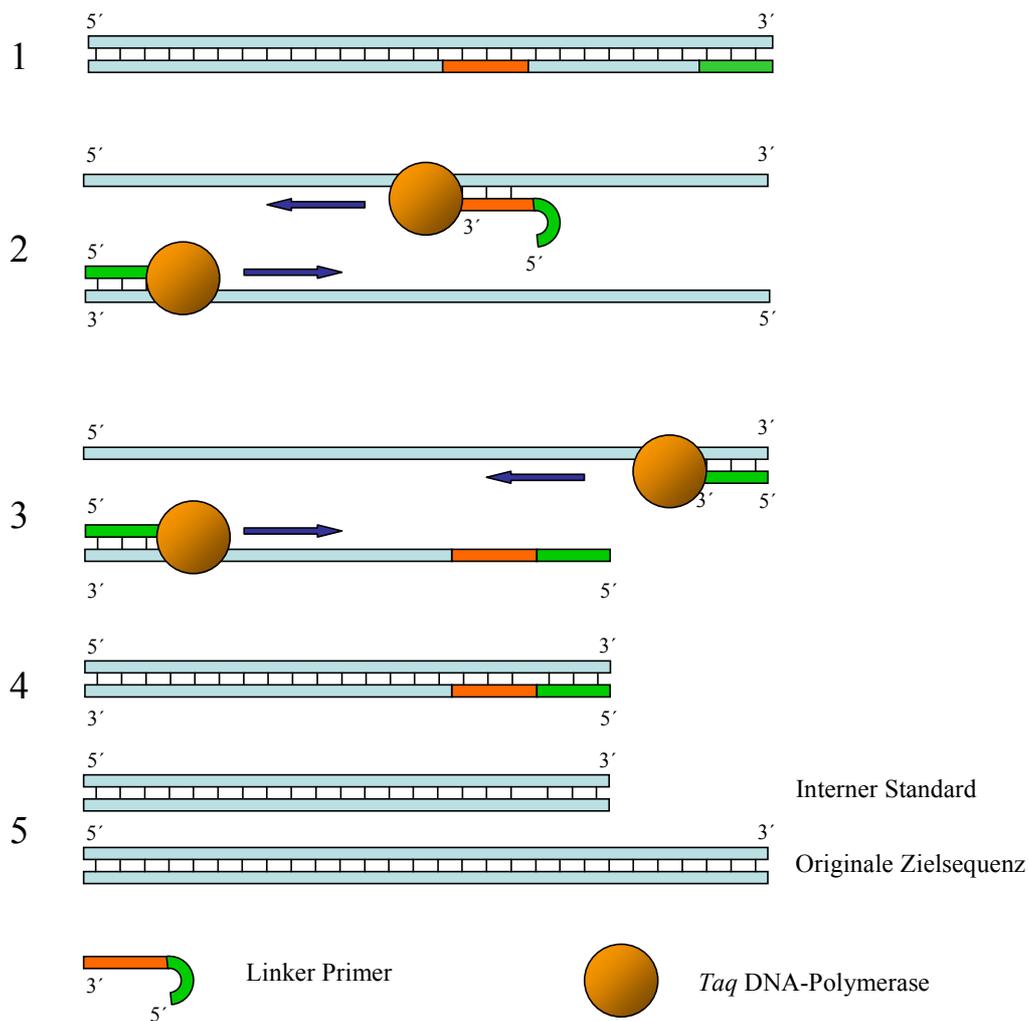


Abb 4.3 Herstellung eines Standards. 1. Initiale cDNA wird erhitzt und in zwei Strängen gespalten. 2. In der zweite Reaktion haftet der Linker Primer auf dem kodierenden Strang und mit Hilfe der *Taq* Polymerase wird ein komplementärer Strang synthetisiert. 3 und 4. Im nächsten Zyklus wird der vorher synthetisierte komplementäre Strang als Matrix benutzt und so ein verkürztes Endprodukt erzeugt. 5. Vergleich Zielsequenz mit internem Standard.

Gen	Linker-Primersequenz (in 5' zu 3'Richtung)	Fragment (bp)	Standard (bp)	Färbefaktor (Fragment/Standard)
<b>h-IAP-1</b>	GGT AGT CTC CGC TGC AAT ATT TCC TTT TAC	680	533	1,2758
<b>XIAP</b>	GAA ACT GAA CGA TAT TTG CAC CCT GGA TAC	446	264	1,6894

Tab 4.2 Übersicht der Linker-Primer und der Färbefaktor zur Konstruktion des internen Standards.

#### 4.4.6 Bestimmung der Molekülzahl der Standard-DNA Fragmente

Nach der Konstruktion des Standards wurde eine Sequenzierung durchgeführt und dann kloniert (s. Kap 4.7). Nach Sequenzierung und Identifizierung des richtigen Klons wurde das Standard von der Plasmid DNA durch Restriktion herausgeschnitten (s. Kap. 4.8). Nach gelektrophoretischer Auftrennung, wurde das Standard dann aus dem Agarosegel herausgeschnitten und daraus eluiert (s. Kap. 4.6). Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wurde die Standardmolekülenzahl nach folgender Formel bestimmt. (Formel 4.2). Dabei muss die Anzahl der Basen von der Restriktionsstelle bis zum Anfang bzw. Ende des Standards berücksichtigt werden, da das durch die Klonierung gewonnene Standard leicht länger ist.

(4.2)

$$x = \frac{A_{260} \cdot V_F \cdot N_{Av}}{(n_A \cdot A_A) + (n_T \cdot A_T) + (n_G \cdot A_G) + (n_C \cdot A_C)}$$

$x$	Molekülzahl pro l
$A_{260}$	Absorption bei 260 nm
$V_F$	Verdünnungsfaktor
$N_{Av}$	Avogadro Konstante ( $N_{Av} = 6,0221367 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ )
$n_A, n_T, n_G, n_C$	Anzahl der jeweiligen Nukleotide des DNA Fragmentes
$A_A, A_T, A_G, A_C$	Absorptionskoeffizient der jeweilige Nukleotide

Nach der Bestimmung der Standardmolekülenzahl wurden Verdünnungsreihen in 10er Schritten gefertigt und mehrere PCR mit normalen RTs durchgeführt um den Äquivalenzpunkt zu bestimmen. Danach wurden 5-6 Verdünnungsreihen um diesen Punkt für jedes Gen hergestellt und die Aliquots bei -20°C gelagert.

#### 4.4.7 Auswertung der kompetitiven RT-PCR

Die PCR-Produkte von Standard- und Zielsequenz wurden, wie in Abb 4.4 A dargestellt, über ein Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf einem UV-Transilluminator photographiert und danach mit einem Scanner digitalisiert. Die Flächenintegrale der Fragmente wurden mit

dem Software Programm AIDA™ (AIDA evaluation software, Raytest, Straubenhardt, Deutschland) ermittelt und die graphische Auswertung mit Excel™ erfolgt. Wegen des Längenunterschiedes von Standard- und Zielfragment wird bei gleicher molekularer Konzentration weniger Ethidiumbromid im Standard als im Zielfragment interkaliert. Daher wurden die Flächenintegrale des Standards zunächst mit einem Färbefaktor korrigiert (Zielsequenz in bp/ Standardsequenz in bp). Wie Abb. 4.4 B zeigt, wurde dann der Logarithmus des Quotienten der Flächenintegrale aus korrigiertem Standard und Zielfragment gegen den Logarithmus der eingesetzten Standardmoleküle aufgetragen. Dabei muss beachtet werden, dass beim Standardfragment beide cDNA Stränge amplifiziert werden, während beim RNA/cDNA Hybrid des RT Produktes nur der cDNA Strang vervielfältigt wird. Daraus wie aus der Formel (4.3) ersichtlich, stellt  $b$  bei  $x = 0$  (d.h. Standardsequenz = Zielsequenz) das gewünschte Ergebnis, nämlich die Anzahl der Zielsequenz-mRNA-Moleküle in der anfangs eingesetzten Gesamt-RNA, dar.

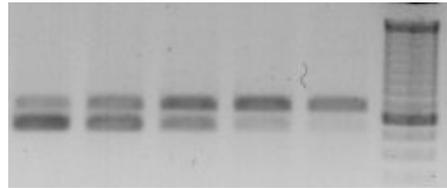
$$(4.3) \quad y = ax + b$$

## 4.5 DNA-Gelelektrophorese

Die DNA-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Molekülen entsprechend ihrem Molekulargewicht. Dazu wird die negative Ladung, die die DNA aufgrund der Phosphatgruppen besitzt zu Nutze gezogen. In einem elektrischen Feld wandert die DNA zur Anode hin. Wenn das Ganze durch ein Medium stattfindet in dem DNA-Stücke mit unterschiedlicher Länge unterschiedliche Geschwindigkeiten aufweisen, werden diese entsprechend ihren Molekulargewicht getrennt.

Das Agarosegel wurde durch Aufkochen von 1% w/v Agarose in 1x TBE-Puffer, Mischen auf einem Magnetrührer, Zugabe von Ethidiumbromid (1 µl/100 ml Gel-Lösung) und Gießen des Gels in eine Gelform mit einem Probenkamm vorbereitet. Die DNA-Proben wurden nach dem Zusatz von 1/10 Vol loading buffer aufgetragen. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurde parallel ein Molekulargewichtsstandard, eine sog. DNA-Leiter aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Proben erfolgte in einer mit TBE gefüllten Elektrophoresekammer in der ein elektrisches Feld mit einer Spannung zwischen 70 und 120 Volt (4 V/cm) appliziert wurde. Die DNA wurde im Agarosegel durch das Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht fotografiert.

A



B

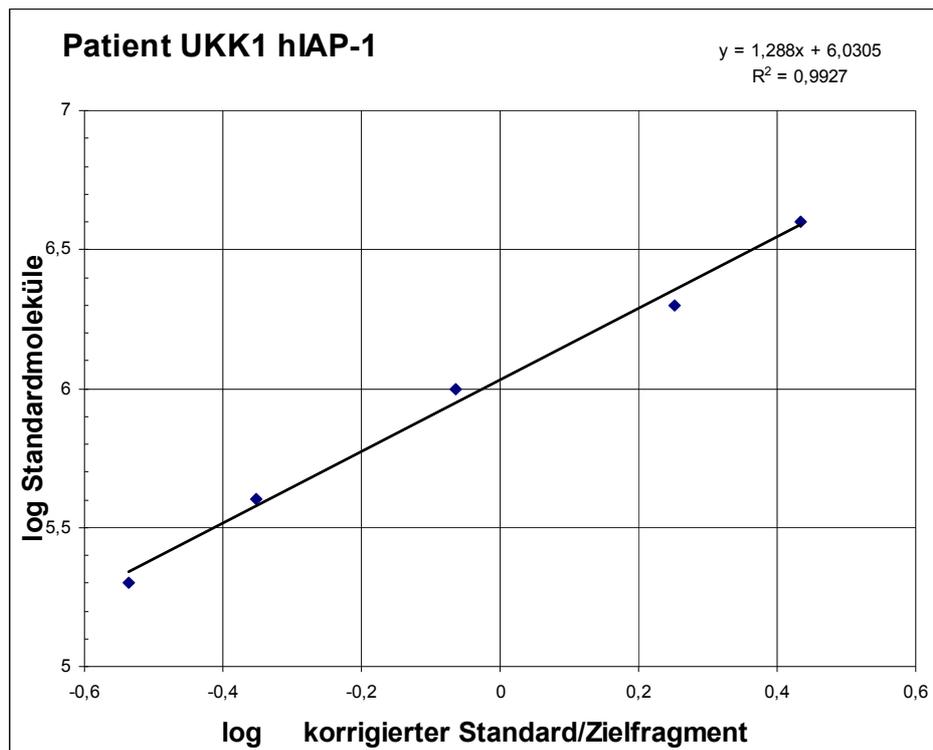


Abb 4.4 A. Ergebnis einer PCR. Wie in Abb 4.1 dargestellt abnehmende Standardkonzentration von links nach rechts. B. Ergebnis der gleichen PCR nach Densitometrie, bei  $x=0$

## 4.6 Elution von cDNA Fragmenten aus Agarosegelen

Nach erfolgter DNA-Separation im Agarosegel wurde ein cDNA Segment mit der erwünschten Größe aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA daraus eluiert. Dafür können verschiedene Methoden verwendet werden

### 4.6.1 Elution über semipermeable Membran

Das ausgeschnittene Agarosegelstück wird in einem semipermeablen Dialyseschlauch (Spectra/Por® Membrane MWCO 1000, Spectrum Medical Industries, California, USA) mit TE Puffer eingebracht und in einer Elektrophoresekammer eingetaucht. Wie zuvor bei der Gelelektrophorese wird ein elektrisches Feld erzeugt (120V über 20 min), und die DNA wandert aus dem Gel Richtung Kathode im TBE Puffer und auf der semipermeablen Membran. Anschließend werden die Polen in der Elektrophoresekammer getauscht. Mit einer kurzzeitigen elektrischen Stromabgabe von wenigen Sekunden werden die DNA-Anteile, die an der Membran haften wieder im TBE Puffer abgegeben. Anschließend mit einer Pipette der TE Puffer mit der darin gelöster DNA in einem Reaktionsgefäß überführt. Danach wird die DNA gefällt.

### 4.6.2 DNA-Fällung

Im Reaktionsgefäß wurde 2,5 Vol Ethanol (oder 0,7 Vol Isopropanol) und 0,1 Vol 3M Ammoniumacetat hinzugefügt und gemischt. Das Reaktionsgemisch wurde über 1h bei -70°C erhitzt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation über 40 Min bei 4°C. Der Überstand wurde abgesaugt und es erfolgten zwei Waschzyklen mit 70% Ethanol. Dabei wurden 500µl Ethanol hinzugefügt und der Ansatz über 20 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Nach dem zweiten Zyklus wurde das DNA-Pellet in ca 20µl sterilem H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

## 4.7 Klonierung der PCR Fragmenten

Um große Mengen an DNA aus PCR-Fragmenten zu erzeugen, kann man diese Fragmente durch Klonierung in bakterielle Plasmide einbringen und vermehren. Dabei muss das DNA – Fragment zuerst in einem Plasmid-Vektor ligiert und dieser danach in Bakterien transformiert werden.

Die Taq DNA Polymerase baut am 3'-Ende eines DNA Stranges ein zusätzliches Adenosin ein. Diese Eigenschaft wird benutzt für das sog. TA-Cloning. Hier wurde das pCR® II Dual Promoter Vector Kit (Invitrogen Corp.) benutzt. Der im Kit mitgelieferte linearisierte Vektor

besitzt Thymidin Enden, so daß es zu einer effektiven Insertion des PCR Fragments im Vektor kommen kann. Zur Ligation des PCR Produkts im linearisierten Vektor kam das Quick Stick<sup>®</sup> DNA Ligation Kit (Bioline) zum Einsatz. Dabei wurde eine rekombinante T4-DNA Ligase verwendet, die einer Inkubation über 5 Minuten bei Raumtemperatur benötigt.

Es wurde folgender Ansatz verwendet:

cDNA	40 ng
pCR <sup>®</sup> II Vector (molekulares Verhältnis PCR Produkt/Vektor ca 3/1)	100ng,
QS DNA Ligase	1 µl
4xQS Puffer	5µl
sterile Aq. bidest	ad 20µl

Der Ansatz wurde anschließend über 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde der Ansatz mit im Kit mitgelieferten kompetenten E.coli gemischt und die Zellsuspension über 1 h bei 37°C and 250rpm inkubiert.

Für das "blue white staining" wurden LB Agar Plates mit 50µg/ml Ampicillin vorbereitet und 40 µl of X-Gal Lösung (40mg/ml) and 40 µl IPTG Lösung (100mM) addiert. Anschließend wurden 300µl der Zellsuspension über die vorgewärmten LB Agar Platen verteilt und bei 37°C über 24 Stunden inkubiert. Von jeder Plate wurden dann 10 weisse Kolonien herausgepickt und in 5 ml LB-Medium (mit 100µg/ml Ampicillin) bei 37°C übernacht inkubiert. Im Folgenden wurde die Plasmid-DNA mittels einer Minipräp isoliert. Dafür wurde das Qiagen<sup>®</sup> Miniprep Kit verwendet. 12µg der Plasmid-DNA wurde dann mit 2µl des Restriktionsenzym EcoR1 (BioLab) geschnitten. Der pCR<sup>®</sup> II Vector weist zwei EcoR1 Restriktionsstellen auf (eine auf dem jeweiligen Ende der inserierten Sequenz). Anschließend wurden sieben Klone, die das zu erwartende Restriktionsmuster aufwiesen, sequenziert. (s. Kap. 4.9). Für die Sequenzierungsreaktion wurden 500ng ungeschnittene Plasmid DNA, 3µl Big Dye<sup>®</sup> und 5pg eines von zwei Primern (M13 reverse oder T7 primer) verwendet. Diese Primer erkennen die korrespondierende Promotorregionen, von denen jeweils eine Stromaufwärts und eine Stromabwärts der inserierten Sequenz im Vektor liegt. Gleichzeitig darf keine solche Restriktionsenzymstelle in der zu klonierende Sequenz beinhaltet sein. In

Abb. 4.5 zeigt exemplarisch das Ergebnis der Sequenzierung des internen Standards für das Gen hIAP-1 dar.

Von den positiven Klonen wurden Bakterienstammlösungen zur weiteren Verwendung angefertigt (500µl Bakteriensuspension und 500µl steriles 50% Glycerol) und bei -20°C eingefroren.

## 4.8 Bakterienkulturen und Isolierung der Plasmid DNA

Zur Identifizierung der richtigen Klonen wurden 15µl der Bakteriensuspension in 3 ml LB-Flüssigmedium (mit 100 µg/ml Ampicillin, 50µg/ml Kanamycin) gegeben und bei 37°C und 200 min<sup>-1</sup> übernacht kultiviert. Anschließend wurde die DNA mittels einer Minipräparation mit JETquick Plasmid Mini Prep, (Genomed, Bad Oyenhausen) entsprechend der Herstellerangaben isoliert.

Bei der Produktion größerer Menge DNA Plasmids, wie bei der Herstellung der DNA Standards wurden 30 µl der Bakterienstammlösung in 50 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin, 50µg/ml Kanamycin) vermischt und bei 37°C und 200 min<sup>-1</sup> eine Übernachtskultur angesetzt. Anschließend wurde die Plasmid DNA mit Hilfe des Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert.

## 4.9 DNA Restriktion

Durch die DNA Präparation wurde die Plasmid DNA isoliert. Nur ein kleiner Teil dieses Plasmids aber entspricht die erwünschte DNA. Anschließend folgte also eine DNA Restriktion. Dabei wird die DNA innerhalb bzw. in der Nähe ihrer spezifischen Erkennungsequenz durch Restriktionsendonukleasen geschnitten. Durch die Auswahl bestimmter Restriktionsenzyme können definierte DNA-Fragmente erzeugt oder ein DNA Stück auf das Vorhandensein der entsprechenden Erkennungssequenzen untersucht werden. Durch Elektrophorese wurden die Produkte sichtbar gemacht und die erwünschte DNA Banden wurden anschließend eluiert und sequenziert. Der typische Restriktionsansatz:

---

DNA	zu schneidende Menge
10x Restriktionspuffer	1/10 des Ansatzvolumens
Restriktionsenzym	1 U/ $\mu$ g eingesetzter DNA
Steriles H <sub>2</sub> O	zur Einstellung des Ansatzvolumens

Normalerweise wird 1 h bei 37°C mit 1 U/ $\mu$ g DNA verdaut. Um eine vollständige Restriktion sicherzustellen wurde der Ansatz 2h bei 37°C mit etwa 3 U/ $\mu$ l DNA inkubiert. Nach der Restriktion wurden die Restriktionsenzyme durch 2 minütiges Erhitzen auf 95°C inaktiviert. Danach wurde die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt.

#### 4.10 DNA Sequenzierung

Zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung müssen die gewonnene DNA Fragmente sequenziert werden. Dabei findet eine Polymerasenkettenreaktion mit Farbstoffmarkierten Diphosphat Basen statt. Sobald eine Diphosphatbase am PCR Produkt integriert wird kann die Polymerase keine weiteren Basen entlang der Ziel-DNA anbinden, so entstehen unterschiedlich lange DNA Stücke, deren letzte Base markiert sind. Die Proben werden elektrophoretisch getrennt und durch ein Scanner werden die Sequenzen gelesen.

Zur DNA-Sequenzierung wurde ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit der Firma Amersham verwendet.

Es wurde folgender Ansatz vorbereitet:

Sequencing reagent pre-mix	8 $\mu$ l
DNA	5 $\mu$ l
Sterile Aq. Bidest	6 $\mu$ l
M 13 reverse primer (5pmol) oder T7 primer	1 $\mu$ l

Der Ansatz wird gemischt und in einem Thermocycler eingebracht. Dabei wurden 30 Zyklen mit 95°C über 40 sec, 50°C über 30sec, 60°C über 4 min programmiert.

Zu dem Ansatz wurden 7 $\mu$ l 7,5 M Ammoniumacetat und 2,5 Vol Ethanol (96%) hinzugefügt und eine DNA Fällung durchgeführt (s. 4.5.2). Das Pellet wurde in 4 $\mu$ l loading dye aufgelöst. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben und die automatische Auswertung erfolgte

mit einem ABI Prism 373 DNA Sequencer (Perkin Elmer, Weiterstadt) im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Martin-Luther Universität Halle Wittenberg (Dr. G. Kaltenborn) In Abb. 4.5 ist ein exemplarisches Ergebnis einer Sequenzierung.

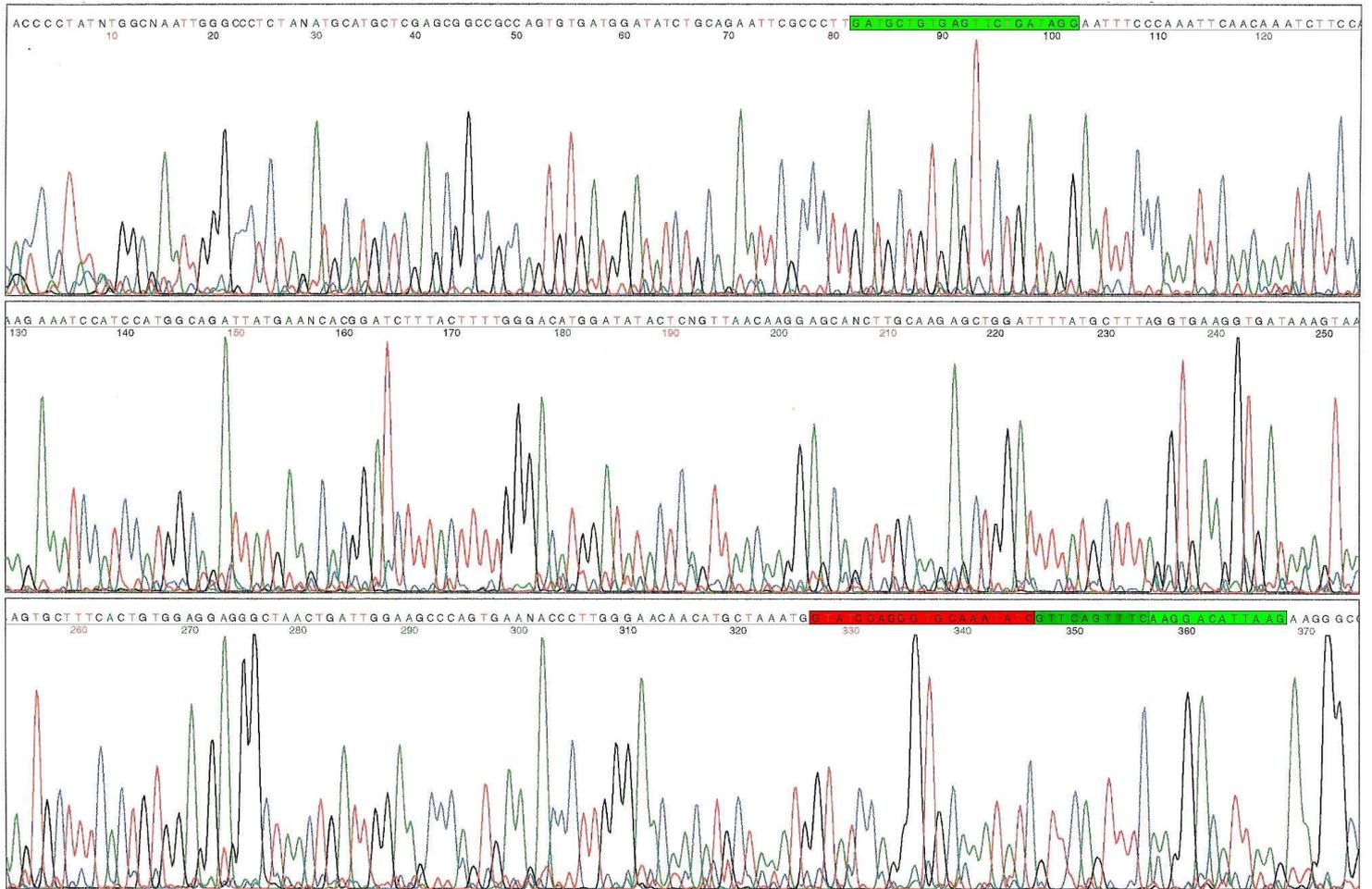


Abb. 4.5 Ergebnis der Sequenzierung des internen Standards für das Gen hIAP-1. Die Sequenzen der entsprechenden Primern wurden farblich verdeutlicht. (s. auch im Vergleich Abb 4.3 Reihe 4)

## 5. Ergebnisse

### 5.1 hIAP-1 und XIAP mRNA Konzentrationen bei Herzinsuffizienz

Die mRNA Konzentration von hIAP-1 und XIAP wurde mittels kompetitiven Standardkalibrierten RT-PCR bestimmt.

Die hIAP-1 mRNA Konzentration bei terminal herzinsuffizienten Patienten war signifikant herabreguliert um 61 % in Vergleich zu Spendern (Spender  $1618 \pm 124$  amol/ $\mu$ g Gesamt-RNA, Patienten  $635 \pm 89$  amol/ $\mu$ g RNA,  $p = 0,0000154$ ). Die XIAP mRNA zeigte nur eine grenzwertig signifikante Tendenz zur Herabregulation um 31% (Spender  $203 \pm 50$ , Patienten  $140 \pm 19$  amol/ $\mu$ g RNA,  $p = 0,0514$ ). (Abb. 5.1)

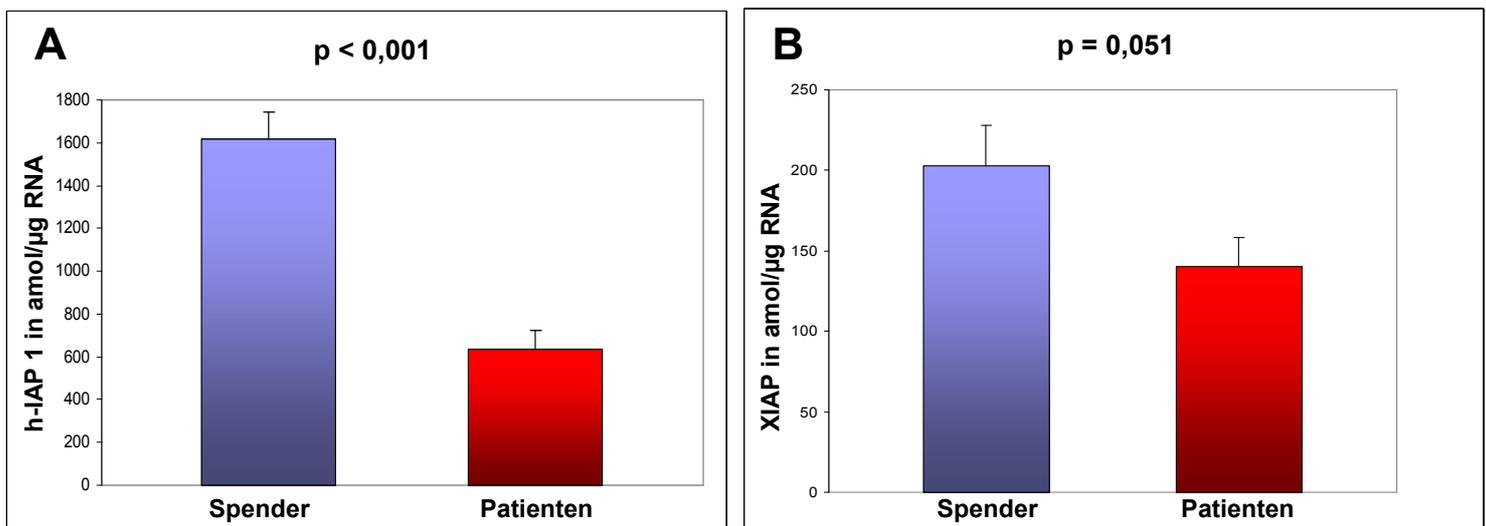


Abb. 5.1. mRNA Expression bei Spendern und Patienten mit Herzinsuffizienz für hIAP-1 (A) und XIAP (B).

Insgesamt zeigte sich eine interindividuell große Variation der mRNA Expression beider Gene sowohl bei Patienten (Abb 5.2) als auch, zu einem geringeren Grad, bei Spendern (nicht gezeigt) Die relativen XIAP und hIAP-1 Konzentrationen der einzelnen Patienten korrelierten miteinander, wie die Abbildung 5.3 illustriert. Dabei wurden die für das jeweilige Genprodukt bestimmten Konzentrationen in Verhältnis zum jeweiligen Mittelwert gesetzt, wobei 100% dem Mittelwert entspricht. In der linearen Regressionsanalyse war diese Korrelation sogar signifikant. (bei Patienten  $r^2 = 0,48$ ,  $p < 0,001$ , (Abb 5.4) bei Spendern  $r^2 = 0,41$ ,  $p < 0,01$ ) (nicht gezeigt)

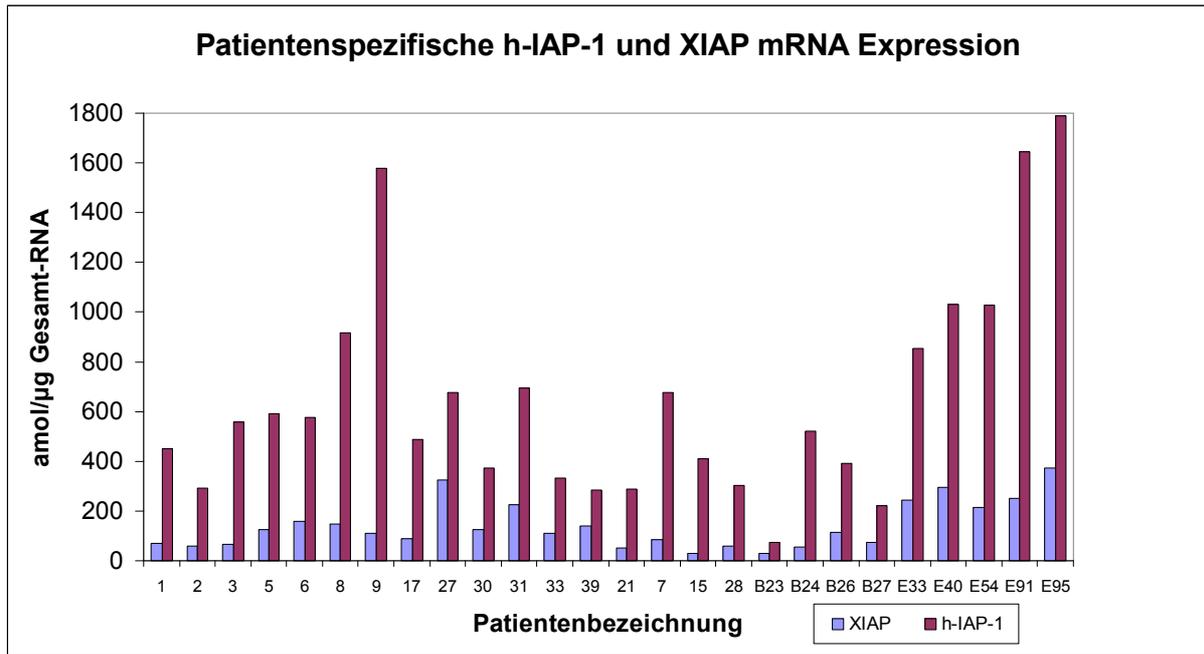


Abb. 5.2. Darstellung der absoluten jeweils pro Patient gemessenen h-IAP 1 und XIAP mRNA Konzentrationen.

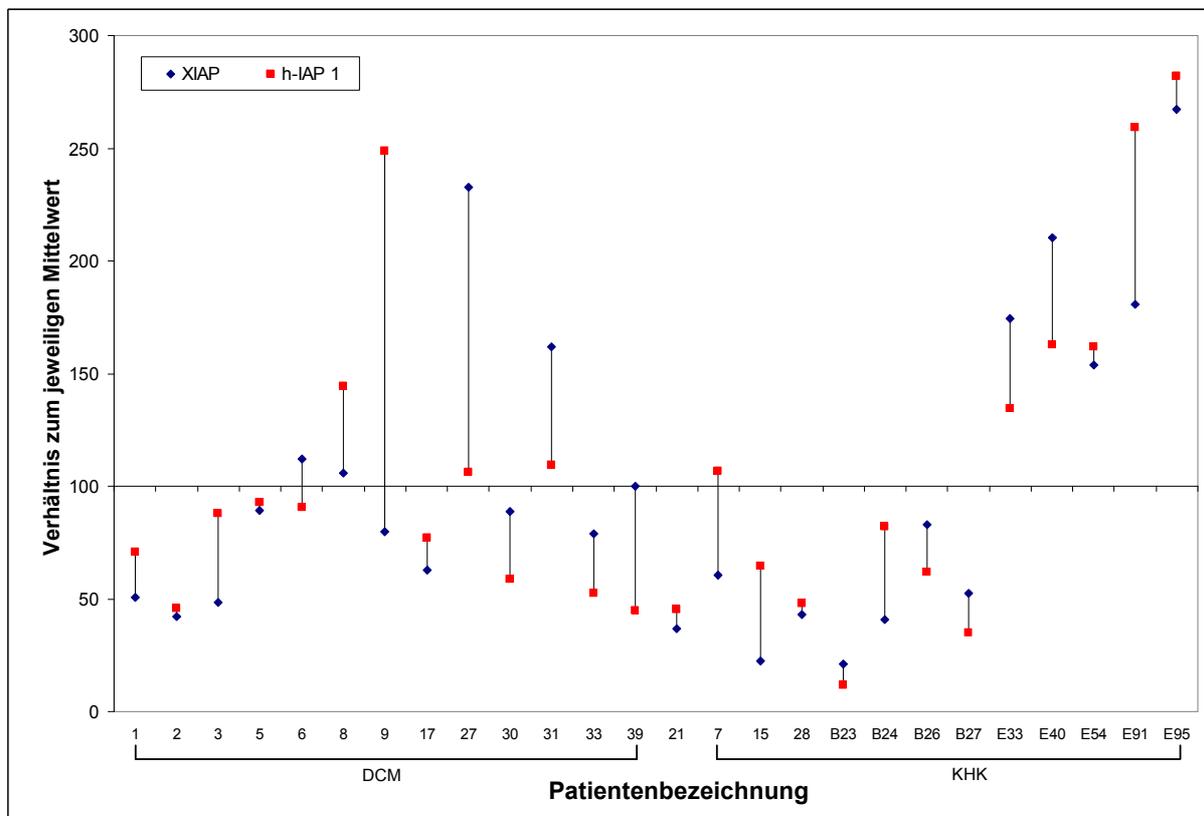


Abb. 5.3 Darstellung der relativen patientenspezifischen hIAP-1 und XIAP Konzentrationen in Verhältnis zum für das jeweilige Genprodukt ermittelten Mittelwert.

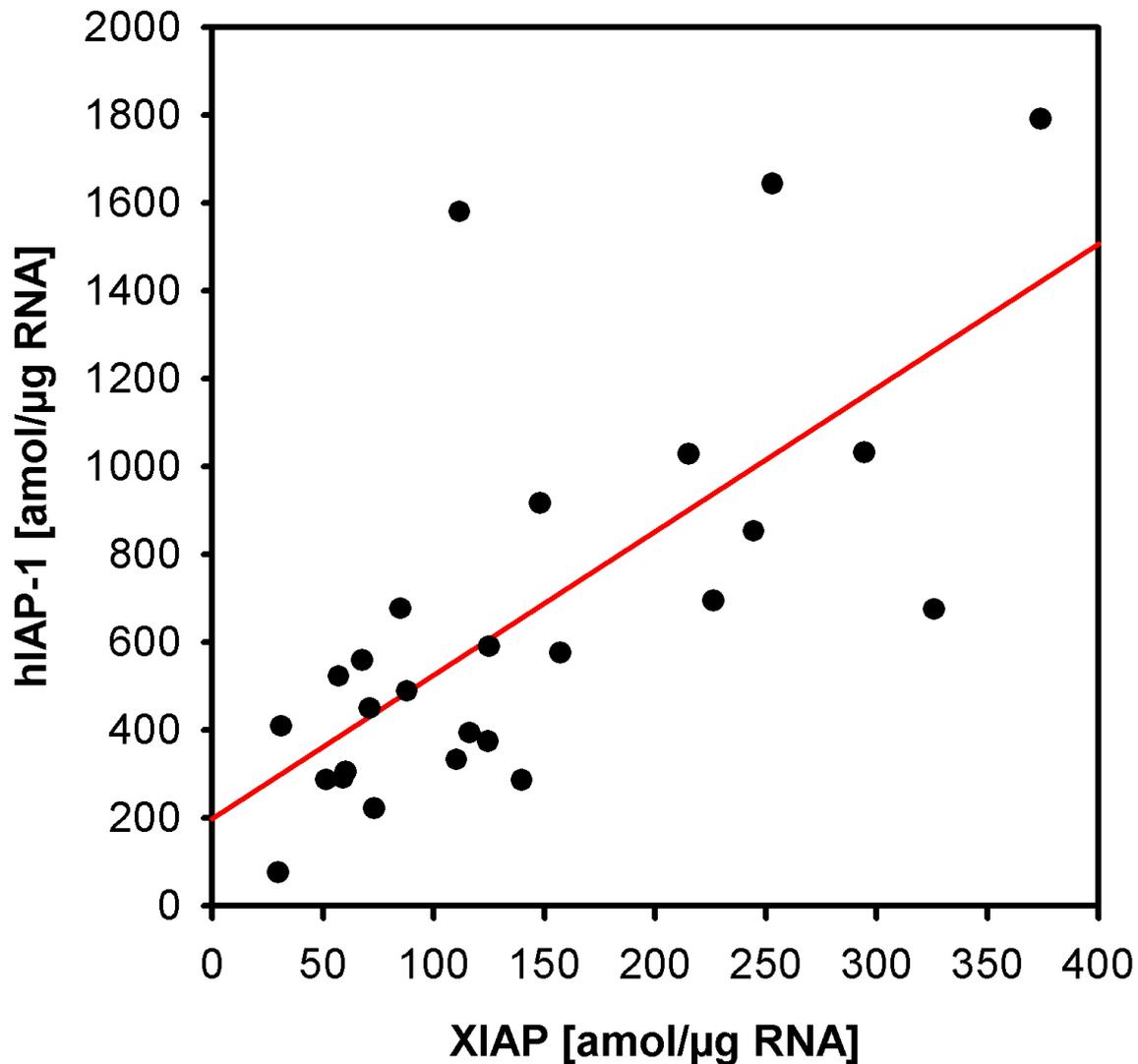


Abb 5.4 Lineare Regressionsanalyse der XIAP und hIAP-1 mRNA Expression bei Patienten  $r^2 = 0,48$ ,  $p < 0,001$

Wenn die Patienten in Untergruppen von dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und ischämischer Kardiomyopathie (ICM) getrennt werden, kommen gewisse Unterschiede zum Vorschein. Bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie sind beide Genprodukte herabreguliert im Vergleich zu Patienten mit koronarer Herzerkrankung; diese Veränderungen sind jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 5.5).

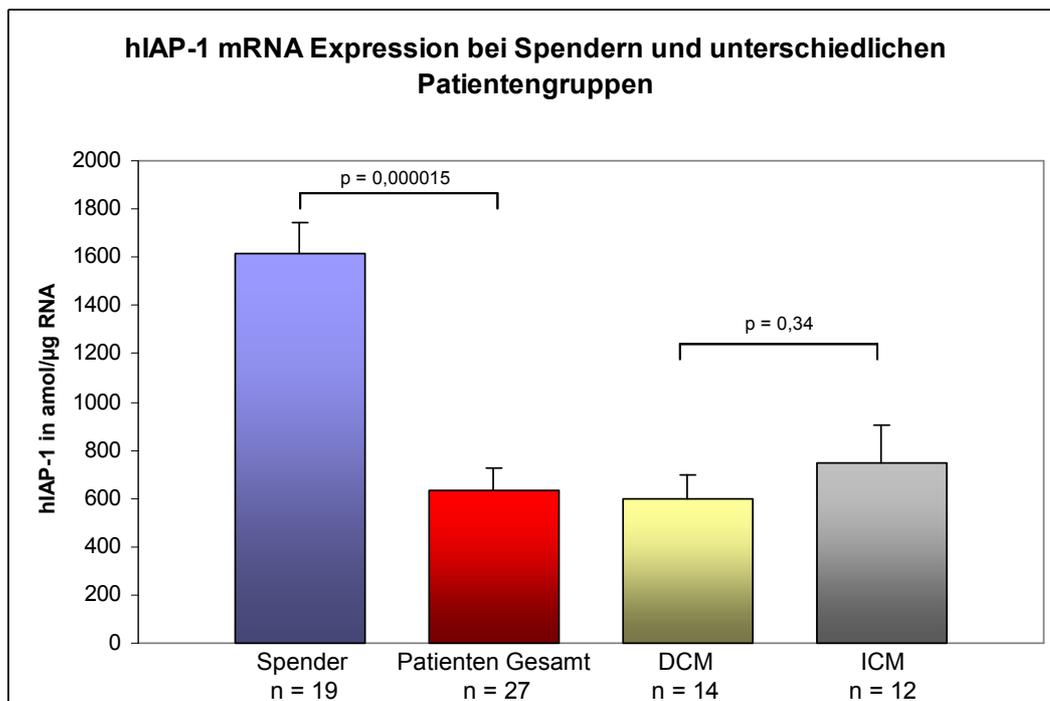
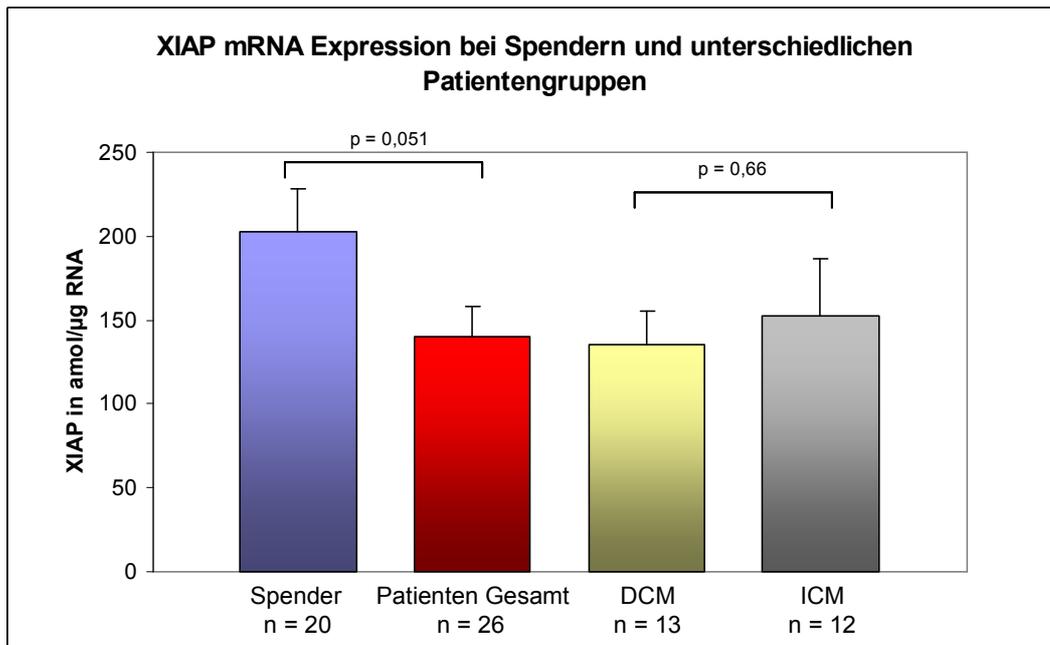


Abb. 5.5 Konzentrationen der Genprodukte XIAP und hIAP-1 bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie und ischämischer Kardiomyopathie. Ein Patient konnte nicht eindeutig als DCM oder ICM angeordnet werden. Bei hIAP-1 konnte ein Spender und bei XIAP ein Patient aus technischen Gründen nicht in der Auswertung berücksichtigt werden.

## 5.2 Auswirkung der Pharmakotherapie auf hIAP-1 und XIAP mRNA Konzentrationen.

In Tabellen 5.1 und 5.2 werden die Werte der Patienten anhand ihrer Pharmakotherapie verglichen.

<b>Pharmakotherapieauswirkung auf die XIAP mRNA Expression</b>				
Werte in amol/ $\mu$ g RNA				
<b>Mittelwert Patienten Gesamt</b>				<b>140 amol/mg RNA</b>
<b>Pat mit ACE Hemmer</b>		<b>Pat. Ohne ACE Hemmer</b>		
n	Mittelwert	n	Mittelwert	p
16	143	10	135	0,83
<b>DCM mit ACE-Hemmer</b>		<b>DCM ohne ACE-Hemmer</b>		
n	Mittelwert	n	Mittelwert	p
11	139	2	114	n.b.
<b>KHK mit ACE-Hemmer</b>		<b>KHK ohne ACE-Hemmer</b>		
n	Mittelwert	n	Mittelwert	p
5	153	7	153	0,99
<b>Pat mit Betablocker</b>		<b>Pat. Ohne Betablocker</b>		
n	Mittelwert	n	Mittelwert	p
7	115	19	149	0,33
<b>DCM mit Betablocker</b>		<b>DCM ohne Betablocker</b>		
n	Mittelwert	n	Mittelwert	p
4	159	9	124	0,37
<b>KHK mit Betablocker</b>		<b>KHK ohne Betablocker</b>		
n	Mittelwert	n	Mittelwert	p
2	59	10	172	n.b.
<b>Pat mit Betablocker &amp; ACE-Hemmer</b>		<b>Pat. Ohne Betablocker &amp; ohne ACE-Hemmer</b>		
n	Mittelwert	n	Mittelwert	p
4	139	7	157	0,74
<b>DCM mit Betablocker &amp; ACE-Hemmer</b>		<b>DCM ohne Betablocker &amp; ohne ACE-Hemmer</b>		
n	Mittelwert	n	Mittelwert	p
3	165	1	88	n.b.
<b>KHK mit Betablocker &amp; ACE-Hemmer</b>		<b>KHK ohne Betablocker &amp; ohne ACE-Hemmer</b>		
n	Mittelwert	n	Mittelwert	p
1	60	6	169	n.b.
<b>Pat mit Kalziumantagonisten</b>		<b>Pat. Ohne Kalziumantagonisten</b>		
n	Mittelwert	n	Mittelwert	p
6	71	19	161	0,0014
<b>DCM mit Kalziumantagonisten</b>		<b>DCM ohne Kalziumantagonisten</b>		
n	Mittelwert	n	Mittelwert	p
2	74	11	146	n.b.
<b>KHK mit Kalziumantagonisten</b>		<b>KHK ohne Kalziumantagonisten</b>		
n	Mittelwert	n	Mittelwert	p
4	69	8	195	0,025

<b>Pharmakotherapieauswirkung auf die XIAP mRNA Expression</b>				
Werte in amol/ $\mu$ g RNA				
Mittelwert Patienten Gesamt				140 amol/mg RNA
Pat mit Nitrate		Pat. Ohne Nitrate		
n	Mittelwert	n	Mittelwert	p
13	88	13	192	0,005
DCM mit Nitrate		DCM ohne Nitrate		
n	Mittelwert	n	Mittelwert	p
7	108	6	167	0,19
KHK mit Nitrate		KHK ohne Nitrate		
n	Mittelwert	n	Mittelwert	p
5	68	7	214	0,017
Pat mit Digitalis		Pat. Ohne Digitalis		
n	Mittelwert	n	Mittelwert	p
12	134	14	145	0,75
DCM mit Digitalis		DCM ohne Digitalis		
n	Mittelwert	n	Mittelwert	p
10	147	3	96	0,18
KHK mit Digitalis		KHK ohne Digitalis		
n	Meßwert	n	Mittelwert	p
1	85	11	159	n.b.

Tabelle 5.1 Auswirkung der Pharmakotherapie auf die Expression des Genprodukts XIAP. p-Werte wurden erst ab  $n \geq 3$  gemessen. Unter den Patienten die ACE-Hemmer einnahmen war einer nicht eindeutig als DCM oder KHK anzuordnen.

<b>Pharmakotherapieauswirkung auf die hIAP-1 mRNA Expression</b>				
Werte in amol/ $\mu$ g RNA				
Mittelwert Patienten Gesamt				635 amol/mg RNA
Pat mit ACE Hemmer		Pat. Ohne ACE Hemmer		
n	Mittelwert	n	Mittelwert	p
16	703	11	535	0,36
DCM mit ACE-Hemmer		DCM ohne ACE-Hemmer		
n	Mittelwert	n	Mittelwert	p
11	640	3	287	0,07
KHK mit ACE-Hemmer		KHK ohne ACE-Hemmer		
n	Mittelwert	n	Mittelwert	p
5	842	7	677	0,64
Pat mit Betablocker		Pat. Ohne Betablocker		
n	Mittelwert	n	Mittelwert	p
7	607	20	654	0,86
DCM mit Betablocker		DCM ohne Betablocker		
n	Mittelwert	n	Mittelwert	p
4	784	10	476	0,35
KHK mit Betablocker		KHK ohne Betablocker		
n	Mittelwert	n	Mittelwert	p
2	413	10	812	n.b.

<b>Pharmakotherapieauswirkung auf die hIAP-1 mRNA Expression</b>				
Werte in amol/ $\mu$ g RNA				
Mittelwert Patienten Gesamt			635 amol/mg RNA	
<b>Pat mit Betablocker &amp;</b>		<b>Pat. Ohne Betablocker &amp;</b>		
<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>p</b>
4	789	8	599	0,59
<b>DCM mit Betablocker &amp;</b>		<b>DCM ohne Betablocker &amp;</b>		
<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>p</b>
3	950	2	287	n.b.
<b>KHK mit Betablocker &amp;</b>		<b>KHK ohne Betablocker &amp;</b>		
<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>p</b>
1	305	6	703	n.b.
<b>Pat mit Kalziumantagonisten</b>		<b>Pat. Ohne Kalziumantagonisten</b>		
<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>p</b>
6	332	20	721	0,0046
<b>DCM mit Kalziumantagonisten</b>		<b>DCM ohne Kalziumantagonisten</b>		
<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>p</b>
2	390	12	593	n.b.
<b>KHK mit Kalziumantagonisten</b>		<b>KHK ohne Kalziumantagonisten</b>		
<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>p</b>
4	303	8	967	0,011
<b>Pat mit Nitrate</b>		<b>Pat. Ohne Nitrate</b>		
<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>p</b>
14	491	13	789	0,09
<b>DCM mit Nitrate</b>		<b>DCM ohne Nitrate</b>		
<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>p</b>
8	593	6	526	0,75
<b>KHK mit Nitrate</b>		<b>KHK ohne Nitrate</b>		
<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>p</b>
5	370	7	1014	0,026
<b>Pat mit Digitalis</b>		<b>Pat. Ohne Digitalis</b>		
<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>p</b>
13	600	14	667	0,70
<b>DCM mit Digitalis</b>		<b>DCM ohne Digitalis</b>		
<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>p</b>
11	621	3	354.9	0,07
<b>KHK mit Digitalis</b>		<b>KHK ohne Digitalis</b>		
<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>p</b>
1	676	11	752	n.b.

Tabelle 5.2 Auswirkung der Pharmakotherapie auf der Expression des Genprodukts hIAP-1. p-Werte wurden erst ab  $n \geq 3$  gemessen. Unter den Patienten die ACE-Hemmer einnahmen war einer nicht eindeutig als DCM oder KHK einzuordnen.

Die Studie war statistisch nicht ausgelegt um definitive Aussagen über Expressionsveränderungen anhand der medikamentösen Therapie zu treffen, da die Anzahl der dafür benötigten Patientenproben enorm steigern würde. Trotzdem sind daraus Muster zu erkennen. Aus den oberen Tabellen sind synoptisch folgende Aussagen zu treffen:

- 
- Die Pharmakotherapie beeinflusst die Expression der Apoptoseinhibitoren.
  - Insgesamt werden hIAP-1 und XIAP auf ähnlicher Weise beeinflusst.
  - Eine ACE-Hemmer-Therapie bewirkt keinen Unterschied auf die XIAP mRNA-Expression. Auf der hIAP-1 Expression jedoch war eine tendenzielle, aber statistisch nicht signifikante Erhöhung zu verzeichnen insbesondere bei den Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie.
  - Eine Therapie mit Betablocker führt tendenziell zu einer Herabregulation der Apoptoseinhibitoren bei ischämischer Kardiomyopathie und hat den gegenteiligen Effekt bei Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie. Hier ist allerdings die Anzahl der Patienten mit Betablocker in der Medikation zu gering.
  - Eine Kombinationstherapie mit Betablocker und ACE-Hemmer zeigt nur eine leichte, statistisch nicht signifikante Erhöhung der hIAP-1 mRNA Expression.
  - Patienten mit Kalziumantagonist und Patienten mit Nitrat im Therapieregime zeigen eine starke, in beiden Fällen signifikante, Herabregulation der Apoptoseinhibitoren.
  - Eine Therapie mit Digitalis hat keine Auswirkung auf die Expression von XIAP und hIAP-1.

## 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- $\kappa$ B Antioxidantien, insbesondere die Superoxiddismutase-2, erhöhen und somit den Anfall an freien Radikalen reduzieren (Kairisalo et al 2007). Eine Inhibition von NF- $\kappa$ 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.

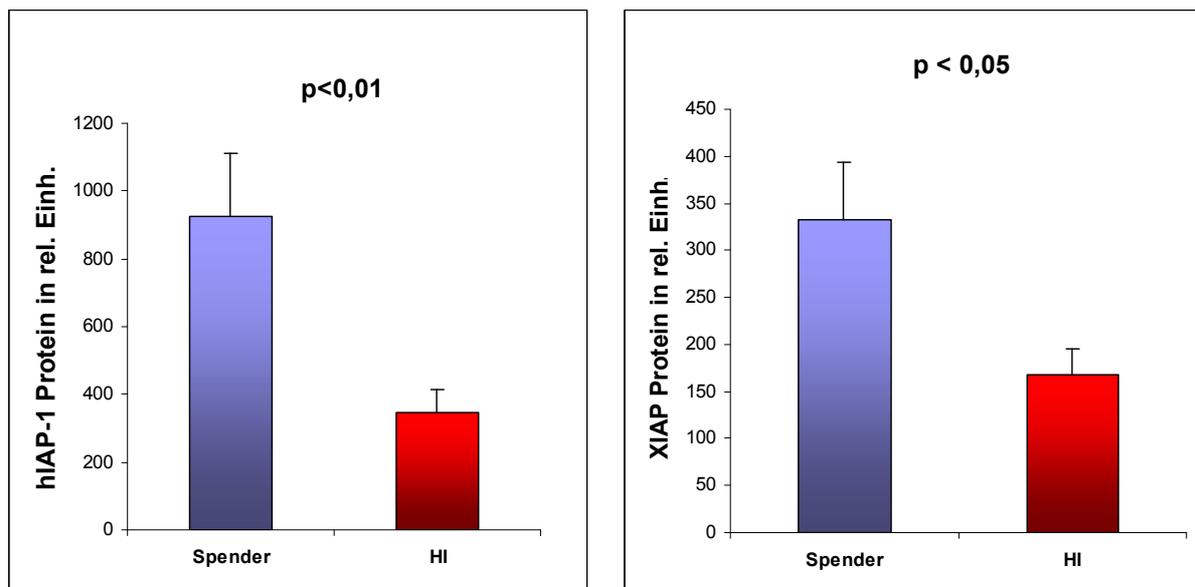


Abb. 6.1 Western Blot Analyse der Expression von hIAP-1 und XIAP bei Spendern und Patienten mit Herzinsuffizienz (HI).

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 $\alpha$  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 $\alpha$  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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B knockout Mäuse zeigten nach Infarkt eine deutlich bessere kardiale Funktion und höheres Überleben als Wildtyp (Kawano et al 2006). NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B Zielgenen tatsächlich exprimiert werden spielen, ist sicherlich ein spannendes Forschungsfeld auch im Hinblick von NF- $\kappa$ B und NF- $\kappa$ 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.

## 7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde anhand einer standard-kalibrierten kompetitiven RT-PCR die endogene mRNA Expression der Apoptoseinhibitoren XIAP und hIAP-1 untersucht.

Die Apoptoseinhibitoren hIAP-1 und XIAP sind bei herzinsuffizienten Patienten, trotz aktivierter und in den meisten Fällen noch nicht vollendeter Apoptose nicht höher exprimiert sondern herabreguliert und zwar bei Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie tendentiell stärker als bei Patienten mit einer ischämischen Kardiomyopathie, wobei es eine sehr große interindividuelle Variation gibt. Wenn man diese Ergebnisse in Kontext setzt mit der mittlerweile bekannten hohen myokardialen Expression der IAP-Antagonisten smac/DIABLO und HtrA2/Omi, die in der Lage sind XIAP und hIAP-1 in ihrer Funktion zu hemmen und auch entweder direkt oder über der Induktion einer Autoubiquitylierung sie zu abzubauen, 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. Diese Auffassung wird verstärkt durch das Verhalten vom Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, welches die IAP hochreguliert. NF- $\kappa$ B selbst ist im Myokard hochexprimiert ohne, aus noch zu entdeckenden Gründen, auf die XIAP und hIAP-1 Gene zu zielen.

Die zweite Fragestellung war inwiefern die Pharmakotherapie die Genexpression von hIAP-1 und XIAP beeinflusst. Dies geschieht auf unterschiedlicher Weise, wobei das verfügbare Probematerial nicht einer adäquat großen Stichprobe entspricht, um statistisch signifikante Ergebnisse zu liefern zudem insgesamt eine große interindividuelle Variation sich zeigte. ACE Hemmer tendieren zu einer Verminderung der IAP-Herabregulation bei Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung. Betablocker vermindern die IAP-Herabregulation bei Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie, aber haben den gegenteiligen Effekt bei Patienten mit einer ischämischen Kardiomyopathie. Es gab allerdings nur eine sehr kleine Anzahl an Patienten mit Betablocker in der Medikation. Patienten mit einer kombinierten Therapie mit ACE-Hemmer und Betablocker zeigen eine leichte Erhöhung der hIAP-1 mRNA Expression. Kalziumantagonisten und Nitrate schließlich verstärken signifikant die Herabregulation der Apoptoseinhibitoren im Vergleich zu Patienten ohne dieses Therapieregime. Möglicherweise führt eine Nitrat-Therapie zu einem erhöhten Aufkommen von reaktiven Sauerstoffradikalen mit negativen Folgen auf die Mitochondrien.

## 8. Bibliographie

1. Abraham MC, Shaham S. Death without caspases, caspases without death. *Trends Cell Biol.* 14 (2004) 184-193.
2. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions of the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 26 (2001) 61-66.
3. Adachi M, Suematsu S, Suda T, Watanabe D, Fukuyama H, Ogasawara J, Tanaka T, Yoshida N, Nagata S. Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 93 (1996) 2131-2136.
4. Adrain C, Creagh EM, Martin SJ. Defying death: showing Bcl-2 the way home. *Nat Cell Biol* 5 (2003) 9-11.
5. Ai Z, Yin L, Zhou X, Zhu Y, Zhu D, Yu Y, Feng Y. Inhibition of surviving reduces cell proliferation and induces apoptosis in human endometrial cancer. *Cancer* 107 (2006) 746-756.
6. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of The Cell 4th edition, Garland Science 2002 ISBN 0-8153-4072-9.
7. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87 (1996) 171.
8. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* 3 (1997) 917-921.
9. Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, Martinou JC. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J.* 345 (2000) 271-278.
10. Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC. Bax is present in a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 11615-11623.
11. Anversa P. Myocyte Death in the pathological heart. *Circ Res.* 86 (2000) 121-124.
12. Anversa P, Kajstura J, Leri A, Bolli R. Life and death of cardiac stem cells: a Paradigm shift in cardiac biology. *Circulation* 113 (2006) 1451-1463.
13. Anversa P, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Myocyte growth and cardiac repair *J Mol Cell Cardiol* 34 (2002) 91-105.
14. Anversa P, Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature* 415 (2002) 240-243.
15. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281 (1998) 1305-1308.

16. Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11 (1999) 255-260.
17. Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17 (1998) 3261-3270.
18. Bartke T, Pohl C, Pyrowolakis G, Jentsch S. Dual role of BRUCE as an antiapoptotic IAP and a chimeric E2/E3 ubiquitin ligase. *Mol Cell* 14 (2004) 801-811.
19. Bergmann MW, Loser P, Dietz R, von Harsdorf R. Effect of NF- $\kappa$ B inhibition on TNF- $\alpha$ -induced apoptosis and downstream pathways of cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 33 (2001) 1223-1232.
20. Birnbaum MJ, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J. Virol.* 68 (1994) 2521-2528.
21. Broeker LE, Kruyt FAE, Giaccone G. Cell Death independent of Caspases. *Clin Cancer Res.* 11 (2005) 3155-3162.
22. Bubici P, Papa S, Pham CG, Zazzeroni F, Franzoso G. NF- $\kappa$ B and JNK: an intricate affair. *Cell Cycle* 3 (2004) 1524-1529.
23. Byun SS, Yeo WG, Lee SE, Lee E. Expression of surviving in renal cell carcinomas: association with pathologic features and clinical outcome. *Urology* 69 (2007) 34-37.
24. Chai J, Shiozaki E, Srinivasula SM, Wu Q, Datta P, Alnemri ES, Shi Y. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* 104 (2001) 769-780.
25. Chen Z, Naito M, Hori S, Mashima T, Yamori T, Tsuruo T. A human IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 264 (1999) 847-854.
26. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81 (1995) 505-512.
27. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid isolated from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18 (1979) 5294-5299.
28. Chipuk JE, Green DR. Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6 (2005) 268-275.
29. Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Kuwana T, Newmeyer DD, Green DR. PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* 309 (2005) 1732-1735.
30. CIBIS Investigators and Committee. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS II): a randomized trial. *Lancet* 353 (1999) 9-13.

31. Chua CC, Gao J, Ho YS, Xiong Ym Chen Z, Hamdy RC, Chua BH. Overexpression of IAP-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *Biochim Biophys Acta* 1773 (2007) 577-83.
32. Clerk A, Cole SM, Cullingford TE, Harrison JG, Jormakka M, Valks DM. Regulation of cardiac myocyte cell death. *Pharm Ther* 97 (2003) 223-261.
33. Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J. Virol.* 67 (1993) 2168-2174.
34. Cohen GM, Sun XM, Farnhead H, MacFarlane M, Brown DG, Snowden RT, Dinsdale D. Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes *J.Immunol* 153 (1994) 507-516.
35. Communal C, Sumandea M, de Tombe P, Narula J, Solaro RJ, Hajjar RJ. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 6252-6256.
36. Consensus Trial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study. *N Engl J Med* 316 (1987) 1429-1435.
37. Cotman CW, Anderson AJ. A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimers's disease. *Mol Neurobiol.* 10 (1995) 19-45.
38. Crow MT, Mani K, Nam YJ, Kitsis RN. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ. Res.* 95 (2004) 957-970.
39. Dai Y, Rahmani M, Dent P, Grant S. Blockade of histone deacetylase inhibitor-induced RelA/p65 acetylation and NF-kappaB activation potentiates apoptosis in leukaemia cells through a process mediated by oxidative damage, XIAP downregulation, and c-Jun N-terminal kinase 1 activation. *MolCell Biol.* 25 (2005) 5429-5444.
40. Davoodi J, Lin L, Kelly J, Liston P, MacKenzie AE. Neuronal apoptosis-inhibitory protein does not interact with Smac and requires ATP to bind caspase-9. *J Biol Chem* 279 (2004) 40622-40628.
41. De Moisaac D, Gurevich RM, Zheng H, Singal PK, Kirshenbaum LA. Caspase activation and mitochondrial cytochrome c release during hypoxia-mediated apoptosis of adult ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 32 (2000) 53-63.
42. Deveraux, QL., Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS, Reed JC. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J.* 18 (1999) 5242-5251.
43. Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 17 (1998) 2215-2223.
44. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388 (1997) 300-304.

45. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102 (2000) 33-42.
46. Duckett CS, Li F, Wang Y, Tomaselli KJ, Thompson CB, Armstrong RC. Human IAP-like protein regulates programmed cell death downstream of Bcl-xL and cytochrome c. *Mol Cell Biol.* 18 (1998) 608-615.
47. Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, Clem RJ, Van Dongen JL, Gilfillan MC, Shiels H, Hardwick JM, Thompson CB. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J.* 15 (1996) 2685-94.
48. Erlacher M, Michalak EM, Kelly PN, Labi V, Niederegger H, Coultas L, Adams JM, Strasser A, Villunger A. BH-3 only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood* 106 (2005) 4131-4138.
49. Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin A, Kostin S, Zimmermann R, Ullmann C, Lorenz-Meyer S, Schaper J. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 32 (2000) 197-208.
50. Förster E. An improved general method to generate internal standards for competitive PCR. *Biotechniques* 16 (1994) 18-20.
51. Foo RS, Mani K, Kitsis RN. Death begets failure in the heart. *J Clin Invest* 115 (2005) 567-561.
52. Furusu A, Nakayama K, Xu Q, Konta T, Kitamura M. MAP kinase-dependent, NF-kappaB-independent regulation of apoptosis protein genes bei TNF-alpha. *J Cell Physiol.* 210 (2007) 703-710.
53. Garg S, Narula J, Chandrashekhar Y. Apoptosis and heart failure: clinical relevance and therapeutic target *J Mol Cell Cardiol* 38 (2005) 73-79.
54. Gill C, Mestril R, Samali A. Losing heart: the role of apoptosis in heart disease – a novel therapeutic target? *FASEB J* 16 (2002) 135-146.
55. Giroir BP, Johnson JH, Brown T, Allen GL, Beutler B. The tissue distribution of tumor necrosis factor biosynthesis during endotoxemia. *J Clin Invest.* 90 (1992) 693-698.
56. Goldstein DB, Tate SK, Sisodiya SM. Pharmacogenetics goes genomic *Nat. Rev. Genet.* 4 (2003) 937-947.
57. Gori T, Daiber A, Di Stolfo G, Sicuro S, Dragoni S, Lisi M, Münzel T, Forconi S, Parker JD. Nitroglycerine causes mitochondrial reactive oxygen species production: in vitro mechanistic insights. *Can J Cardiol.* 23 (2007) 990-992.
58. Gori T, Mak SS, Kelly S, Parker JD. Evidence supporting abnormalities in nitric oxide synthase function induced by nitroglycerin in humans. *J Am Coll Cardiol.* 38 (2001) 1102-1105.

59. Goyal L. Cell death inhibition: keeping Caspases in check *Cell* 104 (2001) 805-808.
60. Green DR, Apoptotic pathways: Paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 102 (2001) 1-4.
61. Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol* 7 (1998) 267-271.
62. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281 (1998) 1309-1312.
63. Guerra S, Leri A, Wang X, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Kajstura J, Anversa P. Myocyte death in the failing human heart is gender dependent. *Circ. Res.* 85 (1999) 856-866.
64. Gulbins E, Coggeshall KM, Brenner B, Schlottmann K, Linderkamp O, Lang F. Fas-induced apoptosis is mediated by activation of a Ras and Rac protein-regulated signalling pathway. *J Biol Chem* 271 (1996) 26389-26394.
65. Gupta S. Molecular steps of tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Curr Mol Med* 1 (2001) 317-324.
66. Gupta S, Sen S. Role of the NF- $\kappa$ B signalling cascade and NF- $\kappa$ B-targeted genes in failing human hearts. *J Mol Med* 83 (2005) 993-1004.
67. Gupta S, Young D, Maitra RK, Gupta A, Popovic ZB, Yong SL, Mahajan A, Wang Q, Sen S. Prevention of cardiac hypertrophy and heart failure by silencing NF- $\kappa$ B. *J Mol Biol.* 375 (2008) 637-649.
68. Hao Y, Sekine H, Kawabata A, Nakamura H, Ishioka T, Ohata H, Katayama R, Hashimoto C, Zhang X, Noda T, Tsuruo T, Naito M. Apollon ubiquitinates Smac and caspase-9 and has an essential cytoprotection function. *Nat Cell Biol* 6 (2004) 849-860.
69. Harlin H, Reffey SB, Duckett CS, Lindsten T, Thompson CB. Characterization of XIAP-deficient mice. *Mol Cell Biol* 21 (2001) 3604-3608.
70. Haudek SB, Taffet GE, Schneider MD, Mann DL. TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodelling through activation of multiple cell death pathways. *J.Clin. Invest.* 117 (2007) 2692-2701.
71. Hauser HP, Bardroff M, Pyrowolakis G, Jentsch S. A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *J Cell Biol.* 141 (1998) 1415-1422.
72. Hayakawa K, Takemura G, Kanoh M, Li Y, Koda M, Kawase Y, Maruyama R, Okada H, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Inhibition of granulation tissue cell apoptosis during the subacute stage of myocardial infarction improves cardiac remodelling and dysfunction at the chronic stage. *Circulation* 108 (2003) 104-109.
73. Hayakawa Y, Chandra M, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, Shirani J, Brown JH, Dorn GW 2nd, Armstrong RC, Kitsis RN. Inhibition of cardiac myocyte apoptosis improves cardiac function and abolishes mortality in the peripartum cardiomyopathy of Galpha(q) transgenic mice. *Circulation* 108 (2003) 3036-3041.

74. Hedge R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilent L, Dubois G, Lazebnik Y, Zervos AS, Fernander-Alnemri T, Alnemri ES. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 277 (2002) 432-438.
75. Hein S, Arnon E, Kostin S, Schönburg M, Elsässer A, Polyakova V, Bauer EP, Klövekorn WP, Schaper J. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation* 107 (2003) 984-991.
76. Hengartner MO, Horvitz HR. The ins and outs of programmed cell death during *C.elegans* development. *Philos Trans R Soc Lond (Biol.)* 345 (1991) 243-246.
77. Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans* gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature* 356 (1992) 494-499.
78. Higuchi Y, McTieman CF, Frye CB, McGowan BS, Chan TO, Feldman AM. Tumor necrosis factor receptors 1 and 2 differentially regulate survival, cardiac dysfunction, and remodelling in transgenic mice with tumor necrosis factor-alpha-induced cardiomyopathy. *Circulation* 109 (2004) 1892-1897.
79. Ho PK, Hawkins CJ. Mammalian initiator apoptotic caspases. *FEBS J.* 272 (2005) 5436-5453.
80. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348 (1990) 334-336.
81. Huang Y, Park YC, Rich RL, Segal D, Myszka DG, Wu H. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* 104 (2001) 781-790.
82. Ingwall JS, Weiss RG. Ist the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. *Circ Res* 95 (2004) 135-145.
83. Isner JM, Kearney M, Bortman S, Passeri J. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation* 91 (1995) 2703-2711.
84. Jesenberger V, Jentsch S. Deadly Encounter: Ubiquitin meets Apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (2002) 112-121.
85. Jin Z, El-Deiry WS. Overview of Cell Death Signalling Pathways. *Cancer Biol Ther* 4 (2005) 139-163.
86. Juo P, Woo MS, Kuo CJ, Signorelli P, Biermann HP, Hannun YA, Blenis J. FADD is required for multiple signalling events downstream of the receptor Fas. *Cell Growth Differ* 10 (1999) 797-804.
87. Karisalo M, Korhonen L, Blomgren K, Lindholm D. X-linked inhibitor of apoptosis protein increases mitochondrial antioxidants through NF- $\kappa$ B activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 364 (2007) 138-144.

88. Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem* 276 (2001) 3238-3246.
89. Kaur S, Wang F, Venkatraman M, Arsura M. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) inhibits c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) activation by transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) through ubiquitin-mediated proteosomal degradation of the TGF-beta1-activated kinase 1 (TAK1). *J Biol Chem.* 280 (2005) 38599-38608.
90. Kawano S, Kubota T, Monden Y, Tsutsumi T, Inoue T, Kawamura N, Tsutsui H, Sunagawa K. Blockade of NF- $\kappa$ B improves cardiac function and survival after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291 (2006) H1337-H1344.
91. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26 (1972) 239-257.
92. Kim R, Emi M, Tanabe K. Caspase-dependent and -independent cell death pathways after DNA damage (Review). *Oncology Reports* 14 (2005) 595-599.
93. Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S, Uchida Y, Arihiro K. Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *J Pathol* 208 (2006) 319-326.
94. Klionsky, DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290 (2000) 1717-1721.
95. Kostin S, Pool L, Elsässer A, Hein S, Drexler HCA; Arnon E, Hayakawa Y, Zimmermann R, Bauer E, Klövekorn WP, Schaper J. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ. Res.* 92 (2003) 715-724.
96. Kroemmer G, Martin SJ. Caspase-independent cell death. *Nat med* 11 (2005) 725-730.
97. Kuang AA, Diehl GE, Zhang J, Winoto A. FADD is required for DR4- and DR5-mediated apoptosis: lack of trail-induced apoptosis in FADD-deficient mouse embryonic fibroblasts. *J. Biol Chem* 275 (2000) 25065-25068.
98. Kubota T, Miyagishima ; Frye CS, Alber SM, Bounoutas GS, Kadokami T, Watkins SC, McTierman CF, Feldman AM. Overexpression of tumor necrosis factor- $\alpha$  activates both anti- and pro-apoptotic pathways in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 33 (2001) 1331-1344.
99. Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 17 (2005) 525-535.
100. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 115 (2005) 2665-2672.
101. Lewis J, Burstein E, Reffey SB, Bratton SB, Roberts AB, Duckett CS. Uncoupling of the signaling and caspase-inhibitory properties of X-linked inhibitor of apoptosis. *J Biol Chem.* 279 (2004) 9023-9029.

102. Li F, Ackermann EJ, Bennett CF, Rothermel AF, Plescia J, Tognin S, Villa A, Marchisio PC, Altieri DC. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with surviving function. *Nat Cell Biol* 1 (1999) 461-466.
103. Li F, Altieri DC. The cancer antiapoptosis mouse surviving gene: characterization of locus and transcriptional requirements of basal and cell cycle-dependent expression. *Cancer Res.* 59 (1999) 3143-3151.
104. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 396 (1998) 580-584.
105. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G (EndoG) is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412 (2001) 95-99.
106. Liguang Z, Peishu L, Hongluan M, Hong J, Rong W, Wachtel MS, Frezza EE. Survivin expression in ovarian cancer. *Exp. Oncol.* 29 (2007) 121-125.
107. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91 (1997) 479-489.
108. Lin JH, Deng G, Huang QH, Morser J. KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Biochem Biophys Res Commun* 279 (2000) 820-831.
109. Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature.* 379 (1996) 349-353.
110. Liu Z, Sun C, Olejniczak ET, Meadows RP, Betz SF, Oost T, Herrmann J, Wu JC, Fesik SW. Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature* 408 (2000) 1004-1008.
111. Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP et al.: Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation* 106 (2002) 3068-3072.
112. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104 (2001) 487-501.
113. Lu B, Gonzales A, Massion PP, Shyr Y, Shaktour B, Carbone DP, Hallahan DE. Nuclear survivin as a biomarker for non-small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer* 91 (2004) 537-540.
114. Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res.* 58 (1998) 1808-1812.
115. Lu M, Lin SC, Huang Y, Kang YJ, Rich R, Lo YC, Myszyka D, Han J, Wu H. XIAP induces NF- $\kappa$ B activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization. *Mol Cell.* 26 (2007) 672-689.
116. Mann DL, Bristow MR. Mechanisms and Models in heart failure: The biochemical model and beyond. *Circulation* 111 (2005) 2837-2849.

117. Marioni G, Ottaviano G, Marchese-Ragona R, Giacomelli L, Bertolin A, Zanon D, Marino F, Staffieri A. High nuclear expression of the apoptosis inhibitor protein survivin is associated with disease recurrence and poor prognosis in laryngeal basaloid squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol.* 126 (2006) 197-203.
118. Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty NF, Lemoine NR, Savapoulos J, Gray CW, Creasy CL, Dingwall C, Downward J. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem* 277 (2002) 439-444.
119. MERIT-HF Study Group. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* 353 (1999) 2001-2007.
120. Mochizuki H, Goto K, Mori H, Mizuno Y. Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 137 (1996) 120-123.
121. Moretti A, Weig HJ, Ott T, Seyfarth M, Holthoff HP, Grewe D, Gillitzer A, Bott-Flügel L, Schömig A, Ungerer M, Laugwitz KL. Essential myosin light chain as a target for caspase-3 in failing myocardium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 11860-11865.
122. Münzel T, Mülsch A, Kleschyov, A. Mechanisms underlying nitroglycerin-induced superoxide production in platelets: some insight, more questions. *Circulation* 106 (2002) 170-172.
123. Nagakawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase 12 mediates endoplasmic reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- $\beta$ . *Nature* 403 (2000) 98-103.
124. Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 335 (1996) 1182-1189.
125. Narula J, Pandey P, Arbustini E, Haider N, Narula N, Kolodgie FD, Dal Bello B, Semigran MJ, Bielsa-Masdeu A, Dec GW, Israels S, Ballester M, Virmani R, Saxena S, Kharbanda S. Apoptosis in heart failure: Release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999) 8144-8149.
126. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288 (2000) 1053-1058.
127. Ohta T, Eguchi R, Suzuki A, Miyakaze S, Ayuzawa R, Kaji K. Hypoxia-induced apoptosis and tube breakdown are regulated by p38 MAPK but not caspase cascade in an in vitro capillary model composed of human endothelial cells. *J Cell Physiol.* 211 (2007) 673-681.
128. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. Apoptosis in the failing human heart. *N. Engl. J. Med.* 336 (1997) 1131-1141.
129. O'Reilly LA, Strasser A. Apoptosis and autoimmune disease. *Inflamm Res.* 48 (1999) 5-21.

130. Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJ, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J, Yusuf S, Pocock S. Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. *Lancet* 362 (2003) 759-766.
131. Pöttsch O., Sommer B. Bevölkerung Deutschlands bis 2050 . Ergebnisse der 10. koordinierten Bevölkerungsvorausberechnung, Statistisches Bundesamt. 2003
132. Qiu XB, Goldberg AL. The membrane-associated inhibitor of apoptosis protein, BRUCE/Apollon, antagonizes both the precursor and mature forms of Smac and Caspase-9. *J Biol Chem* 280 (2005) 174-182.
133. Rajcanseparovic E, Liston P, Lefebvre C, Korneluk RG. Assignment of human inhibitor of apoptosis protein (iap) genes xiap, hiap-1, and hiap-2 to chromosomes Xq25 and 11q22-q23 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 37 (1996) 404-406.
134. Reed JC. Mechanisms of Apoptosis. *Am J Pathol* 157 (2000) 1415-1430.
135. Regula KM, Kirshenbaum LA. Apoptosis of ventricular myocytes: a means to an end. *J Mol Cell Cardiol* 38 (2005) 3-13.
136. Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sum C, Fesik SW, Liddington RC, Salvesen GS. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 104 (2001) 791-800.
137. Roses AD Pharmacogenetics and future drug development and delivery *Lancet* 355 (2000) 1358-1361.
138. Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral-inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83 (1995) 1243-1252.
139. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The cIAP-1 and cIAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 16 (1997) 6914-6925.
140. Rudin CM, Thompson CB. Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu Rev Med* 48 (1997) 267-281.
141. Saleh M, Vaillancourt JP, Graham RK, Huyck M, Srinivasula SM, Alnemri ES, Steinberg MH, Nolan V, Baldwin CT, Hotchkiss RS, Buchman TG, Zehnbauser BA, Hayden MR, Farrer LA, Roy S, Nicholson DW. Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. *Nature* 429 (2004) 75-79.
142. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signalling by proteolysis. *Cell* 91 (1997) 443-446.
143. Sanna MG, da Silva Correia J, Ducrey O, Lee J, Nomoto K, Schrantz N, Deveraux QL, Ulevitch RJ. IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition. *Mol Cell Biol.* 22 (2002) 1754-1766.

144. Sanna MG, Duckett CS, Richter BW, Thompson CB, Ulevitch RJ. Selective activation of JNK1 is necessary for the anti-apoptotic activity of hILP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95 (1998) 6015-6020.
145. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Heikillä P, Laine P, Mattila S, Nieminen MS, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation. *Eur J Clin Invest* 29 (1999) 380-386.
146. Scarabelli T, Stephanou A, Rayment N, Pasini E, Comini L, Curello S, Ferrari R, Knight R, Latchman D. Apoptosis of endothelial cells precedes myocyte cell apoptosis in ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 104 (2001) 253-256.
147. Schaper J, Elsässer A, Kostin S. The Role of Cell Death in Heart Failure. *Circ Res*. 85 (1999) 867-869.
148. Schapira AH. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease, hereditary spastic paraplegia, and Friedreich's ataxia. *Biochim Biophys Acta* 1410 (1999) 99-102.
149. Scheubel RJ, Bartling B, Simm A, Silber RE, Drogaris K, Darmer D, Holtz J. Apoptotic pathway activation from mitochondria and Death receptors without caspase-3 cleavage in failing human myocardium: Fragile balance of myocyte survival? *J Am Coll Cardiol* 39 (2002) 481-488.
150. Sethi G, Ahn KS, Xia D, Kurie JM, Aggarwal BB. Targeted deletion of MKK4 gene potentiates TNF-induced apoptosis through the down-regulation of NF- $\kappa$ B activation and NF- $\kappa$ B-regulated antiapoptotic gene products. *J Immunol*. 179 (2007) 1926-1933.
151. Shariat SF, Ashfaq R, Karakiewicz PI, Saeedi O, Sagalowsky AI, Lotan Y. Survivin expression is associated with bladder cancer presence, stage, progression and mortality. *Cancer* 109 (2007) 1106-1113.
152. Siednienko J, Jankowska EA, Banasiak W, Gorczyca WA, Ponikowski P. NF- $\kappa$ B activity in peripheral blood mononuclear cells in cachectic and non-cachectic patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol*. 122 (2007) 111-116.
153. Silke J, Hawkins CJ, Ekert PG, Chew J, Day CL, Pakusch M, Verhagen AM, Vaux DL. The anti-apoptotic activity of XIAP is retained upon mutation of both the caspase 3- and caspase 9-interacting sites. *J Cell Biol* 157 (2002) 115-124.
154. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, -10 in a caspase-9-dependent manner. *Cell J Biol* 144 (1999) 281-292.
155. Smale G, Nichols NR, Brady DR, Finch CE, Horton WE Jr. Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease. *Exp. Neurol*. 133 (1995) 225-230.
156. SOLVD Investigators. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart disease. *N Engl J Med*. 325 (1991) 293-302.

157. Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, Alnemri ES. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 410 (2001) 112-116.
158. Starling RC, Hammer DF, Altschuld RA. Human myocardial ATP content and in vivo contractile function. *Mol Cell Biochem* 180 (1998) 171-177.
159. Sugden PH, Clerk A. "Stress-responsive" Mitogen-activated Protein Kinases (c-Jun N-Terminal kinases and p38 Mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ Res* 83 (1998) 345-352.
160. Sun, C., Cai M, Gunasekera AH, Meadows RP, Wang H, Chen J, Zhang H, Wu W, Xu N, Ng SC, Fesik SW. NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP *Nature* 401 (1999) 818-822.
161. Sun C, Cai M, Meadows RP, Xu N, Gunasekera AH, Herrmann J, Wu JC, Fesik SW. NMR structure and mutagenesis of the third BIR domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 33777-33781.
162. Susin SA, Lorenzo HK, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Magnion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlet DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397 (1999) 441-446.
163. Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 8 (2001) 613-621.
164. Suzuki Y, Nakabayashi Y, Nakata K, Reed JC, Takahashi R. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. *J Biol Chem* 276 (2001) 27058-27063.
165. Swedberg K, Hjalmarson A, Waagstein F, Wallentin I. Prolongation of survival in congestive cardiomyopathy by beta-receptor blockade. *Lancet* 1 (1979) 1374-1376.
166. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Sudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC. IAP-family Protein Survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.* 58 (1998) 5315-5320.
167. Takahashi, R., Deveraux QL, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS, Reed JC. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 7787-7790.
168. Takemura G, Ohno M, Hayakawa Y, Misao J, Kanoh M, Ohno A, Uno Y, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Role of apoptosis in the disappearance of infiltrated and proliferated interstitial cells after myocardial infarction. *Circ. Res.* 82 (1998) 1130-1138.
169. Tang G, Minemoto Y, Dibling B, Purcell NH, Li Z, Karin M, Lin A. Inhibition of JNK activation through NF- $\kappa$ B target genes. *Nature* 414 (2001) 313-317.
170. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267 (1995) 1456-1462.

171. Tschopp J, Irmeler M, Thome M. Inhibition of Fas death signals by FLIPs. *Curr Biol* 10 (1998) 552-558.
172. Uren AG, Pakusch M, Hawkins CJ, Puls KL, Vaux DL. Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 4974-4978.
173. Varfolomeev E, Blankenship JW, Wayson SM, Fedorova AV, Kayagaki N, Garp P, Zobel K, Dynek JN, Elliott LO, Wallweber HJ, Flygare JA, Fairbrother WJ, Deshayes K, Dixit VM, Vucic D. IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappa B activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* 131 (2007) 669-681.
174. Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannikulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Goncharov T, Holtmann H, Lonai P, Wallach D. Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9 (1998) 267-276.
175. Vaux DL, Silke J. IAPs, RINGs and Ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (2005) 287-297.
176. Vegrán F, Biodot R, Oudin C, Riedinger JM, Lizard-Nacol S. Distinct expression of Survivin splice variants in breast carcinomas. *Int J Oncol.* 27 (2005) 1151-1157.
177. Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL. Inhibitor of Apoptosis Proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biology* 2 (2001) reviews 3009.1-3009.10.
178. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102 (2000) 43-53.
179. Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly LM, Day CL, Tikoo A, Burke R, Wrobel C, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 277 (2002) 445-454.
180. von Harsdorf R. "Fas-ten" your seat belt: antiapoptotic treatment in heart failure takes off. *Circ. Res.* 95 (2004) 554-556.
181. Vucic D, Stennicke HR, Pisabarro MT, Salvesen GS, Dixit VM. MLIAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr Biol* 10 (2000) 1359-1366.
182. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS. NF-kappa-B antiapoptosis - induction of TRAF1 and TRAF 2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281 (1998) 1680-1683.
183. Wang J, Lenardo MJ. Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *J Cell Sci.* 113 (2000) 753-757.

184. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 15 (2001) 2922-2933.
185. Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, Shirani J, Armstrong RC, Kitsis RN. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest* 111 (2003) 1497-1504.
186. Wong SC, Fukuchi M, Melnyk P, Rodger I, Giaid A. Induction of cyclooxygenase-2 and activation of nuclear factor- $\kappa$ B in myocardium of patients with congestive heart failure. *Circulation* 98 (1998) 100-103.
187. Wu G, Chai J, Suber TL, Wu JW, Du C, Wang X, Shi Y. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 408 (2000) 1008-1012.
188. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270 (1995) 1326-1331.
189. Yang QH, Church-Hajduk R, Ren J, Newton ML, Du C. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev.* 17 (2003) 1487-1496.
190. Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 89 (1997) 1067-1076.
191. Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* 288 (2000) 874-877.
192. Yeh WC, Pompa JL, McCurrach ME, Shu HB, Elia AJ, Shahinian A, Ng M, Wakeham A, Khoo W, Mitchell K, El-Deiry WS, Lowe SW, Goeddel DV, Mak TW. FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* 279 (1998) 1954-1958.
193. Yokoyama T, Nakano M, Bednarczyk JL, McIntyre BW, Entman M, Mann DL. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. *Circulation* 95 (1997) 1247-1252.
194. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin -1 $\beta$ -converting enzyme. *Cell* 75 (1993) 641-652.
195. Zhivotovsky B. Caspases: the enzymes of death. *Essays Biochem* 39 (2003) 25-40.
196. Zineh I, Johnson JA. Pharmacogenetics of chronic cardiovascular drugs: applications and implications. *Expert Opin Pharmacother.* 7 (2006) 1417-1427.

Aus dem Institut für Pathophysiologie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Holtz)

**mRNA-Expression endogener Baculovirus homologer Inhibitoren der Apoptose (IAPs)  
im insuffizienten Myokard.**

**Thesen der Dissertation**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der Medizin (Dr. med.)**

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Konstantinos Drogaris

geboren am 02.03.1976 in Palaio Faliro, Athen

## Thesen

1. Eine alternde Bevölkerung in den Industrienationen, die weiterhin hohe Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen und die, aufgrund der besseren medizinischen Therapiemöglichkeiten, längere Lebenserwartung von Patienten mit Herzinsuffizienz, bedeutet in Zukunft eine wachsende Anzahl an Herzinsuffizienzpatienten.
2. Die Behandlung der Patienten mit Herzinsuffizienz wird demnach zu einer der führenden medizinischen und sozioökonomischen Herausforderungen der nächsten Jahrzehnte. Eine weitere und verstärkte Erforschung der molekularen Grundlagen dieses Symptomkomplexes ist somit geboten.
3. Herzinsuffizienz wird durch ventrikuläre Dysfunktion mit Kontraktilitätsverlust und einer Vielzahl an molekularen, histologischen und morphologischen ungünstigen Anpassungsvorgängen gekennzeichnet. In den meisten Fällen wird der Kontraktilitätsverlust durch Zelluntergang mitverursacht. Dabei finden gleichzeitig in individuell unterschiedlicher Ausprägung Nekrose, Autophagie und Apoptose statt.
4. Außerdem führt nicht nur eine hämodynamische Überlastung des Ventrikels zu einer Herzinsuffizienz sondern auch neurohumorale Faktoren wie die Aktivierung des Renin-Angiotensin Aldosteronsystems, eine erhöhte adrenerge Stimulation sowie immunologische Faktoren bei chronische Inflammation und Entstehung von reaktiven Sauerstoffradikalen.
5. Alle diese Faktoren sind in der Lage Apoptose zu induzieren.
6. Die Apoptoseaktivierung alleine ohne ihre Vollendung mit Untergang der Kardiomyozyten kann zu einer kardialen Dysfunktion führen. Caspase-3 ist zum Beispiel in der Lage Myofilamente direkt anzugreifen.
7. Eine Inhibition der Apoptose bei den Kardiomyozyten aber auch der kardialen Nicht-kardiomyozyten kann das kardiale Remodelling positiv beeinflussen.
8. Die Caspasen, eine evolutionär hochkonservierte Zystein Proteasefamilie, gehören zu den zentralen Ausführungsinstrumente der Apoptose. XIAP und hIAP-1 gehören zu den IAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins) einer ebenfalls evolutionär hochkonservierten Proteinfamilie, die anhand ihrer BIR-Domänen in der Lage sind die Caspasen in ihrer Wirkung zu hemmen. XIAP und hIAP-1 sind allerdings, trotz aktivierter Apoptose im Myokard von herzinsuffizienzen Patienten, auf Proteinebene nicht hoch- sondern herabreguliert.
9. Außerdem sind XIAP und hIAP-1 auch auf mRNA Ebene im Herzen herabreguliert. Trotzdem wird die Apoptose nur in wenigen Kardiomyozyten vollendet.

10. IAP-Antagonisten sind im Herzen hochexprimiert und können zu dieser Herabregulation durch direkten Abbau von XIAP via HtrA2/Omi als auch durch Induktion einer Autoubiquitylierung führen.
11. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, welches unter anderem die XIAP und hIAP-1 Expression induziert, ist im Herzen hochexprimiert. Trotzdem führt das nicht automatisch zu einer erhöhten Expression der IAPs.
12. In neuronalen Zellen, die viele biologische Gemeinsamkeiten mit den Kardiomyozyten teilen, kann NF- $\kappa$ B über XIAP ROS reduzieren und somit den oxidativen Stress vermindern. Nach unseren Ergebnissen ist es aber in Kardiomyozyten von Herzinsuffizienzen Patienten nicht der Fall.
13. 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.
14. Eine ACE-Hemmer-Therapie bewirkt keinen Unterschied auf die XIAP mRNA-Expression. Auf der hIAP-1 Expression jedoch war eine tendenzielle, aber statistisch nicht signifikante Erhöhung zu verzeichnen insbesondere bei den Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie.
15. Eine Therapie mit Nitraten führt zu einer starken Herabregulation der IAPs. Bei Patienten mit diesem Therapieregime war die mRNA Expression der Apoptoseinhibitoren XIAP und hIAP-1 signifikant niedriger als bei den anderen Patienten und als den Spendern. Eine Ursache dafür könnte ein erhöhtes Aufkommen an ROS mit konsequenter mitochondrialen Schädigung sein.
16. Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie tendierten zu einer niedrigeren IAP mRNA Expression als Patienten mit einer ischämischen Kardiomyopathie.
17. Solche Unterschiede machen klar, dass auf molekularer Ebene es doch Unterschiede gibt unter Patienten mit Herzinsuffizienz anhand ihrer Grundkrankheit. Sollte in Zukunft die Apoptose als Ziel einer Pharmakotherapie dienen, soll die Therapiewahl bei jedem Patient mit Hinblick seiner Grunderkrankung differenzierter betrachtet werden.
18. Apoptose findet in ca 0,05% aller Kardiomyozyten statt, nekrotische Veränderungen sind um das Fünffache häufiger und Übergänge von Apoptose zu Nekrose sind fließend. In Zukunft sollen verstärkt auch die Interaktionspunkte zwischen den verschiedenen Zelluntergangsformen untersucht werden.

## **A. Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Konstantinos Drogaris

Berlin, den 15. Februar 2008

## **B. Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich erkläre hiermit, dass ich nur diesen Antrag auf Zulassung zum Promotionsverfahren eingereicht habe. Die Arbeit wurde bisher weder im In- oder Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Konstantinos Drogaris

Berlin, den 15. Februar 2008

## **C. Veröffentlichungen**

Scheubel RJ, Bartling B, Simm A, Silber RE, **Drogaris K**, Darmer D, Holtz J. Apoptotic pathway activation from mitochondria and Death receptors without caspase-3 cleavage in failing human myocardium: Fragile balance of myocyte survival? *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 481-488.

Scheubel RJ, Bartling B, Simm A, Silber RE, **Drogaris K**, Darmer D, Holtz J. Activation of apoptotic initiator caspases and downregulation of endogenous inhibitors of apoptosis in terminally failing human hearts. *Eur J Heart Fail* 2001; 3: 66-67.

**Drogaris K**, Scheubel RJ, Bartling B, Silber RE, Darmer D, Holtz J. Im insuffizienten Myokard ist erhöhte Expression endogener, Baculovirus-homologer Inhibitoren der Apoptose nicht am Schutz vor aktivierter zytosolischer Apoptose beteiligt. *Z Kardiologie* 90: II-204; 2001

## D. Tabellarischer Lebenslauf

<b><i>Persönliche Daten</i></b>	Konstantinos Drogaris geboren am 02.03.1976 in Palaio Faliro, Athen verheiratet, 2 Kinder griechische Staatsangehörigkeit
<b><i>Schulbildung</i></b>	
1981 – 1987	Grundschule/ Athen
1987 – 1989	Gymnasium/ 2. Gymnasium Palaio Phaliro, Athen
1989 – 1992	Gymnasium/ Scuola Europea di Varese, Italien
1992 – 1994	Gymnasium/ Europese School Bergen, Niederlande
05.07.1994	European Baccalaureate Certificate (Abitur), Muttersprache Englisch
<b><i>Studium-Ausbildung</i></b>	
10/1994	Anfang des Medizinstudiums an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
09/1996	Ärztliche Vorprüfung
08/1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2000	Beginn des Praktischen Jahres
10/2000 - 02/2001	Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
02/2001 - 05/2001	Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Martin Luther Universität Halle-Wittenberg
05/2001 - 08/2001	Klinik für Innere Medizin I, St. Elisabeth Krankenhaus, Halle
11.12.2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01.07.2003	Erteilung ärztlicher Approbation
<b><i>Ärztliche Tätigkeit</i></b>	
17.12.2001 - 14.06.2003	Arzt im Praktikum an der Franz Volhard Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie Universitätsklinikum Charité der Humboldt Universität zu Berlin
11/2002 und 02/2003 – 04/2003	Forschungsaufenthalt im Anatomisch-embryologischen Institut Universiteit van Amsterdam.
15.06.2003 - 30.11.2003	Wissenschaftliche Tätigkeit im Labor von Prof. von Harsdorf an der Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum
01.12.2003 – 30.09.2006	Assistenzarzt an der der Franz Volhard Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie, HELIOS Klinikum Berlin-Buch
01.02.2004 - 31.03.2006	Rotation in der Klinik für Intensivmedizin und Nephrologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum
seit 01.10.2006	Assistenzarzt Klinik für Kardiologie und konservative Intensivmedizin Vivantes Klinikum am Urban, Berlin

Konstantinos Drogaris  
Berlin, den 15. Februar 2008

## **E. Danksagung**

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Holtz, Direktor des Instituts für Pathophysiologie, für die Vergabe dieses interessanten Themas und für sein fortwährendes Interesse zum Abschluss der Arbeit bedanken.

Frau Dr. D. Darmer möchte ich besonders bedanken für die Einführung in den molekularbiologischen Techniken und ihren konstruktiven Vorschlägen und Anregungen.

Allen Mitarbeitern des Institutes möchte ich für die entspannte, freundschaftliche Atmosphäre bedanken, die es ermöglichten auch Tage wo die Experimente nicht nach Wunsch liefen mit Humor zu überstehen. Dr. H. Tostlebe und Dr. B. Bartling möchte ich für ihre herzlichen Art, die vielen Tipps und die tatkräftige Unterstützung bedanken. R. Busath, Dr. S. Rohrbach, Dr. R. Scheubel, Dr. M. Tostlebe, möchte ich für die enge und ausgesprochen gute Zusammenarbeit bedanken. Den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau R. Gall und Frau B. Heinze möchte ich für die stets freundliche und zuvorkommende Unterstützung bedanken.

Als letztes möchte ich bei meiner Familie und insbesondere bei meiner Mutter und bei meiner Ehefrau Iveta bedanken. Ohne ihre Unterstützung, Geduld und Motivation hätte diese Arbeit gar nicht entstehen können.